



**Emília Maria dos
Santos Cardoso**

**Avaliação das Células T Reguladoras por Citometria
de Fluxo**



**Emília Maria dos
Santos Cardoso**

**Avaliação das Células T Reguladoras por Citometria
de Fluxo**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Dr^a. Maria Esmeralda Neves – Centro Hospitalar do Porto, Departamento de Patologia, Serviço de Imunologia – e co-orientação da Professora Doutora Maria de Lourdes Pereira – Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos académicos.

“A Grandeza que me rodeia Eleva-me”

Ao André Cardoso, o sétimo da sétima

o júri

presidente

Professora Doutora Anabela Pinto Rolo
Professora Auxiliar Convidada, DBio, Universidade de Aveiro

Dr^a Maria Esmeralda de Azevedo Rodrigues Neves
Médica Especialista em Patologia Clínica, Estudos Especiais
em Immunopatologia, Centro Hospitalar do Porto – Hospital de
Santo António (ex-CICAP)

Doutora Virgília Sofia Silva
Investigadora de Pos-Doc, CESAM, Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Não tenho palavras para exprimir o meu agradecimento e admiração pela Dr^a. Esmeralda Neves, que aceitou, sem hesitar ser minha orientadora. Muito Obrigada.

Agradecer à Dr^a. Judite Guimarães pelo seu conhecimento técnico, total disponibilidade, optimismo, boa disposição e, não menos importante a sua amizade.

À Dr^a. Cecília, Dr^a. Júlia, Marta e Sónia pelo respeito que sempre demonstraram pelo meu trabalho.

À Dra. Conceição Cerveira Diretora do Serviço de Imunologia e a todos que me fizeram sentir benvinda no Serviço.

À minha co-orientadora da Universidade de Aveiro, Professora Maria de Lourdes Pereira, pela possibilidade de concretizar o Mestrado.

À Izasa, CICECO (Universidade de Aveiro) e Administração da LabMED Saúde, pelo apoio financeiro.

Ao Carlos Ribeiro do IBMC.

Ao Dr. Jorge Moreira da LabMED Saúde – Clínica Dr. Mário Moreira, que estimulou a realização deste projeto.

À Margarida Marques, minha querida colega, que vê capacidades em mim que eu um dia vou descobrir.

À Cecilia Mendes a melhor Citometrista.

À Susana Aranha e Teresa Faria, as minhas colegas do coração e fonte de inspiração, as melhores profissionais do mundo, que aguentaram as minhas conversas sobre regulação imunológica e alguma (muita) frustração!

Aos meus Pais e Irmãos (a grandeza que me eleva).

Ao Carlos Torre, pelo passado, presente e futuro!!

Muito obrigada a todos.

palavras-chave

Treg, FoxP3, CD127, Auto-tolerância, Artrite Reumatóide, Auto-Imunidade

resumo

Introdução: As doenças auto-imunes são, no seu conjunto, altamente incapacitantes e mortais, sobretudo no sexo feminino.

Na última década, foi possível associar estas patologias com uma subpopulação de linfócitos T CD4⁺ - **Treg** - responsável pela manutenção da tolerância periférica através de mecanismos de regulação/supressão imunológica.

Atualmente é possível quantificar as Treg através da deteção do fator de transcrição FoxP3, por citometria de fluxo (CMF). Mais recentemente, alguns autores defendem que a marcação de superfície com a IL-R7α (CD127) poderá substituir a marcação intracelular com FoxP3. Contudo, ainda persistem dúvidas relativamente ao fenótipo que possibilita a sua deteção, de forma mais simples e eficaz.

Materiais e Métodos: O projeto inclui 27 amostras de doadores saudáveis e 11 doentes com Artrite Reumatóide. A imunofenotipagem dos linfócitos foi efetuada por CMF, com recurso aos anticorpos anti-CD4 ECD, anti-CD25 FITC, anti-CD127 CY5 (Beckman Coulter) e anti-FoxP3 PE (eBioscience).

Resultados: Amostragem de doadores saudáveis - CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 3,60±2,30%; CD4⁺CD25⁺CD127^{-low} 4,35±1,82%; CD4⁺CD25⁺⁺FoxP3⁺ 1,43±0,77%; CD4⁺CD25⁺⁺CD127^{-low} 1,75±0,85%.

Amostragem de doentes - CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 2,37±0,85%; CD4⁺CD25⁺CD127^{-low} 3,90±1,89%; CD4⁺CD25⁺⁺FoxP3⁺ 1,43±0,65%; CD4⁺CD25⁺⁺CD127^{-low} 2,39±1,36%.

Não foram observadas diferenças significativas entre os marcadores CD127 e FoxP3, e entre doadores e doentes, com P<0,05.

Conclusão: A quantificação da população das Treg recorrendo à marcação de superfície com CD127 poderá ser uma alternativa fiável à utilização de FoxP3. Contudo, as características inerentes à expressão contínua de CD127 e CD25 dificultam o procedimento técnico.

Os valores de referência obtidos no estudo revelaram-se inferiores aos descritos na literatura. Fato, que obriga a um aumento de amostragem para uma correta validação da metodologia.

keywords

Treg, FoxP3, CD127, Self tolerance, Rheumatoid Arthritis, Autoimmunity

abstract

Introduction: Diseases of autoimmune origin are highly disabling and deadly, especially in females. In the last decade, these pathologies were associated to a subpopulation of T CD4⁺ lymphocytes --**Treg** – responsible for the peripheral maintenance through regulation/suppression immune mechanisms.

It is currently possible to quantify Treg by detection of the FoxP3 transcription factor by flow cytometry (FC). Some authors argue that surface marking with CD127 (IL-R7 α), may replace intra-cell marking with FoxP3, although the debate is still on-going.

Material and method: The project includes 27 samples of periphery blood from healthy EDTA K3 donors and 11 samples of AR patients. Phenotyping of lymphocytes was performed by FC, using the antibodies anti-CD4 ECD, anti-CD25 FITC, anti-CD127 CY5 (Beckman Coulter) and anti-FoxP3 PE (eBioscience).

Results: Healthy donors – CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 3,60 \pm 2,30%; CD4⁺CD25⁺CD127^{-low} 4,35 \pm 1,82%; CD4⁺CD25⁺⁺FoxP3⁺ 1,43 \pm 0,77%; CD4⁺CD25⁺⁺CD127^{-low} 1,75 \pm 0,85%.

Patients - CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 2,37 \pm 0,85%; CD4⁺CD25⁺CD127^{-low} 3,90 \pm 1,89%; CD4⁺CD25⁺⁺FoxP3⁺ 1,43 \pm 0,65%; CD4⁺CD25⁺⁺CD127^{-low} 2,39 \pm 1,36%.

No significant differences were observed between markers CD127 and FoxP3, and between donors and patients, P<0,05.

Conclusion: The quantification of the population of Treg using CD127 may be a reliable alternative to FoxP3. However, the characteristics of the expression of CD127 and CD25 hinder technical procedure.

The reference values obtained in the study proved to be lower than those reported in the literature. An increase sampling is necessary for a proper validation of the methodology.

Conteúdo

1	Introdução	1
1.1	Enquadramento e objetivos de estudo	1
1.2	Tolerância Imunológica	3
1.3	Células T Reguladoras	5
1.3.1	Populações de Células T Reguladoras	7
1.3.2	Caracterização fenotípica e funcional das Treg	9
1.3.3	Análise por citometria de fluxo.....	13
1.3.3.1	FoxP3.....	16
1.3.3.2	IL-7R α (CD127).....	17
1.4	Artrite Reumatóide	19
1.4.1	Quantificação e Funcionalidade das Treg em Doentes com AR	21
1.5	Objetivos.....	22
2	Materiais e Métodos	23
2.1	Amostragem.....	23
2.1.1	Reagentes	23
2.1.2	Procedimento Técnico das Amostras	23
2.2	Leitura no Citómetro de Fluxo	25
2.3	Análise Estatística	25
3	Resultados.....	27
3.1	Expressão dos marcadores CD25, CD127 e FoxP3.....	27
3.2	Análise dos LT CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ e CD4 ⁺ CD127 ^{-low}	29
3.3	Relação entre os marcadores CD127, FoxP3 e CD25.....	32
3.4	Avaliação dos marcadores CD4, CD127, FoxP3 e CD25.....	33
3.5	Prevalência da população de Treg em doentes com AR	38
4	Discussão e Conclusão	41
5	Perspetivas Futuras.....	49
6	Bibliografia	51

Lista de Figuras

Figura 1 – Efeito da deficiência das Treg em Humanos e modelo animal.	7
Figura 2 – Subpopulações de células T reguladoras e seus precursores.	8
Figura 3 – Desenvolvimento tímico das células FoxP3 ⁺	11
Figura 4 – Expressão fenotípica da célula T reguladora de origem tímica.	11
Figura 5 – Função supressora das Treg via IL-2.	13
Figura 6 – Expressão de FoxP3 em percentagens significativas de CD4 ⁺ independentemente da expressão de CD25.	18
Figura 7 – Expressão de FoxP3 nos diferentes subgrupos de células T humanas CD4 ⁺ CD127 ^{+/-}	19
Figura 8 – (a) Citograma de contornos de densidade SS versus FS para a aquisição dos linfócitos totais.	27
Figura 9 – Expressão dos marcadores FoxP3-PE e CD127-CY5.	28
Figura 10 – Níveis de expressão do marcador de ativação celular CD25.	29
Figura 11 – (a) Expressão média de FoxP3 em linfócitos T CD4 ⁺ . (b) Percentagem de células CD25 ⁺ CD127 ^{-low} e CD25 ⁺ CD127 ⁺ retirada da subpopulação CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ , de um indivíduo representativo do estudo.	30
Figura 12 – (a) Expressão média de CD127 em linfócitos T CD4 ⁺ . (b) e (c) Percentagem de células CD25 ⁺ FoxP3 ⁻ e CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ retiradas do gate da subpopulação CD4 ⁺ CD127 ^{-low} , CD4 ⁺ CD127 ^{low} , respetivamente, de um dador representativo do estudo.	31
Figura 13 – Representação gráfica da expressão média dos marcadores CD127 e FoxP3, nos três níveis de CD25.	32
Figura 14 – Expressão média de FoxP3 (a) e CD127(b) nos linfócitos T CD4 ⁺ CD25 ⁻	33
Figura 15 – (a) Expressão de CD127 em LT CD4 ⁺ CD25 ⁺ (A) e CD25 ⁺⁺ (B.)	34
Figura 16 – Expressão de FoxP3 em LT CD4 ⁺ CD25 ⁺ (C) e CD25 ⁺⁺ (D).	34
Figura 17 – (b) e (c) Expressão de FoxP3 nos LT CD4 ⁺ CD25 ⁻ CD127 ^{-low} e CD25 ⁺ CD127 ^{-low} , numa amostra de um dador saudável.	35
Figura 18 – Relação entre a expressão de FoxP3 e CD127, nos linfócitos CD4 ⁺	36
Figura 19 – Representação gráfica da expressão de FoxP3 nos diferentes subgrupos de CD127.	37
Figura 20 – (a) e (b) Correlação linear, nas amostras de dadores, entre os LT CD4 ⁺ CD25 ^{+/++} FoxP3 ⁺ e CD25 ^{+/++} CD127 ^{-low}	38
Figura 21 – Comparação entre dadores e doentes. Não foram observadas diferenças significativas entre dadores e doentes, para o mesmo fenótipo da população de Treg.	40
Figura 22 – Correlação linear, nas amostras de doentes, entre os LT CD4 ⁺ CD25 ^{+/++} FoxP3 ⁺ e CD25 ^{+/++} CD127 ^{-low}	40

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Prevalência e funcionalidade das Treg em doenças auto-imunes.	15
Tabela 2 – Percentagem das células FoxP3 ⁺ nos diferentes subgrupos de CD127.....	36
Tabela 3 – Percentagem média da população de Treg nos diferentes fenótipos..	38
Tabela 4 – Percentagens médias da população de Treg nos 4 fenótipos estudados, nos doadores e doentes.....	39

Lista de Abreviaturas

APC	Célula apresentadora de antígenos
AR	Artrite reumatóide
CD25	Cadeia alfa do recetor da interleucina 2
CD127	Cadeia alfa do recetor da interleucina 7
CY5	Isocianina 5
CMF	Citometria de fluxo
CTLA-4	Antígeno 4 associado aos linfócitos T
DC	Célula dendrítica
ECD	Conjugado ficoeritrina – Texas Red
FBS	Soro fetal bovino
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FoxP3	Fator de transcrição Fork head p3
FS	Dispersão da luz frontal
GITR	Recetor do TNF induzido por glucocorticóides

Lista de Abreviaturas

INF-γ	Interferão gama
IL	Interleucina
IPEX	Desregulação imune, poliendocrinopatia, enteropatia, ligada ao cromossoma X
LT	Linfócitos T
DMCD	Drogas modificadoras do curso da doença
MHC	Complexo major de histocompatibilidade
MTX	Metotrexato
PBS	Tampão fosfato salino
PE	Ficoeritrina
SS	Dispersão da luz lateral
TCR	Recetor da célula T
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Célula T reguladora

1 Introdução

1.1 Enquadramento e objetivos de estudo

Cerca de 5% dos europeus sofrem de doenças de natureza auto-imune, e embora não existam dados precisos, calcula-se que atinjam 50 a 60 mil portugueses, sendo 2/3 mulheres. Estas patologias no seu conjunto são uma das principais causas de morte no sexo feminino, sendo a Artrite Reumatoide (AR), um exemplo que afeta duas vezes mais as mulheres que os homens. Com a progressão da doença, os pacientes desenvolvem uma incapacidade para realizarem atividades da vida diária e profissional que se traduz num impacto económico e social negativo para o paciente e para a sociedade. Os elevados custos que o sistema de saúde tem de suportar com esta doença, e outras da área da auto-imunidade, levaram a um crescente interesse no que diz respeito à comparação de diferentes estratégias de tratamentos.

A tentativa, por parte de vários grupos de investigação de compreender os mecanismos responsáveis pelo aparecimento de doenças de natureza auto-imune, levou à descoberta de uma subpopulação de linfócitos T responsável pela manutenção da tolerância periférica através de mecanismos de supressão/regulação imunológica (Gershon & Kondo, 1970).

Na última década, o conhecimento sobre as células responsáveis pela regulação imunológica – **Treg** – evoluiu exponencialmente. O papel instrumental das Treg no controlo da auto-imunidade está bem documentado, existindo numerosos trabalhos que realçam alterações quantitativas e/ou qualitativas das Treg em várias doenças auto-imunes (Dejaco, et al., 2005). Investigadores e clínicos, creem que o futuro do tratamento das doenças auto-imunes reside na modelação do número e modo de atuação desta subpopulação de LT, tendo como finalidade tratamentos que permitam restabelecer a auto-tolerância.

A terapia celular baseada nas Treg será de grande interesse em doenças como a AR, Policondrite Recorrente (PR), Púrpura de Henoch-Schönlen (HSP),

Esclerose Múltipla (EM), Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES). Em doenças com uma progressão contínua como, EM, Síndrome de Sjögren (SS), Polimiosite inflamatória, as Treg poderão ter um papel auxiliar em conjunto com os imunossupressores (Miyara, et al., 2011).

Atualmente, a terapêutica com imunossupressores e/ou imunomoduladores, tais como ciclofosfamida, micofenolato de mofetil, doses altas de corticosteroides e agentes biológicos, tais como anti-TNF α e anti-CD20, apresentam bons resultados. Contudo, o futuro do tratamento das doenças auto-imunes passará pela manipulação das Treg, tendo como objetivo final o restabelecimento da auto-tolerância.

As possibilidades de terapia acima referidas deverão ter em conta a mais recente característica atribuída às Treg: a plasticidade. As Treg têm a capacidade, in vitro e in vivo, de se diferenciar em células T efectoras – TH17 – em ambientes altamente inflamatórios, podendo a sua expansão in vitro, teoricamente, agravar os sintomas da doença (Miyara, et al., 2011; Hafler, et al., 2010). A ativação prévia das células efectoras em relação às Treg permite a aquisição de resistência à supressão mediada pelas Treg in vivo, fator que contribui para o agravamento da patologia (Billiard, et al., 2006). Sendo assim, o tipo de terapêutica baseada na manipulação das Treg deve também ter em consideração os padrões de evolução da doença: progressão contínua, versus remissão/recaída (Miyara, et al. 2011).

A descoberta do gene responsável pelo desenvolvimento e diferenciação das Treg - FoxP3 (Hori, et al., 2003; Fontenot, et al., 2003), despoletou o interesse da comunidade científica. Foram desenvolvidos numerosos estudos que contribuíram para avanços significativos do conhecimento relativos à diferenciação e função das Treg (Seddik, et al., 2006; Hafler, et al., 2010).

Atualmente é possível isolar as Treg através da deteção do fator de transcrição Fork head box p3 -- FoxP3, por citometria de fluxo (CMF). Este método é muito complexo e dispendioso, porque exige a permeabilização e fixação prévia dos linfócitos T.

Alguns autores defendem que a quantificação das Treg pode ser efetuada através da avaliação da expressão dos marcadores de superfície CD25 e CD127. Porém existe ainda muita polémica relativamente a este assunto (Liu, et al., 2006).

Sabe-se que o fenótipo que caracteriza as Treg é $CD4^+CD25^{++}CD127^{low}FoxP3^+$.

A presente dissertação teve como objetivo a comparação dos dois métodos, marcação intracelular com FoxP3 e de superfície com CD127, e posterior obtenção de valores de referência, para a sua futura implementação no Serviço de Imunologia do Centro Hospitalar do Porto – laboratório de referência na auto-imunidade – no estudo de doenças auto-imunes.

Na tentativa de otimizar a quantificação destas células por CMF, pelo método mais simples, procedeu-se à comparação de dois métodos:

- Quantificação através da avaliação da expressão do fator de transcrição FoxP3;
- Avaliação da expressão dos marcadores de superfície CD4, CD25 e CD127.

1.2 Tolerância Imunológica

Uma das principais funções do sistema imune é o reconhecimento de antígenos, que em condições normais, possibilitam o desenvolvimento de mecanismos efetores para eliminação de antígenos externos, e o desenvolvimento de mecanismos de tolerância para antígenos do “próprio”. Apenas um sistema imune extremamente flexível e em equilíbrio terá a capacidade de responder adequadamente. **“A função imunológica normal ocorre entre um limiar que não se traduz, nem por agressão orgânica, nem por manifestações clínicas adversas – designada por tolerância imunológica”** (Borrego, et al., 2007; Arosa, et al., 2007; Cruvinel, et al., 2008; Jonuleit, et al., 2003).

Uma resposta imune desregulada pode ser extremamente deletéria, pelo que embora seja reconhecida a importância da ativação do sistema imune no controlo contra a infeção e neoplasias, são também importantes os mecanismos de regulação altamente eficazes, mediados por citocinas e outros componentes solúveis, assim como por células.

Existem vários mecanismos que permitem proteger o organismo de linfócitos com potencial auto-reativo, tendo como designação geral tolerância.

São descritos dois níveis de tolerância:

- Tolerância central, adquirida por seleção clonal no timo;
- Tolerância periférica, dependente de células especializadas, da qual fazem parte integrante as células T reguladoras (Loebenstein & Schirmer, 2005).

O desenvolvimento dos linfócitos T inicia-se com a migração dos seus precursores linfóides para o timo (timócitos), onde sofrem proliferação, diferenciação e onde são sujeitos a um processo de seleção que resulta no desenvolvimento de células T maduras. O mecanismo dominante na manutenção da tolerância imunológica consiste na eliminação precoce de timócitos que possam reagir com componentes do “próprio” - **tolerância central**. Esta ocorre nos órgãos linfóides primários, na medula óssea e no timo, e consiste em dois processos: seleção positiva e negativa (Kindt, et al., 2007).

Tanto a seleção positiva como a seleção negativa são necessárias para gerar LT maduros restritos ao complexo major de histocompatibilidade (MCH) e simultaneamente auto-tolerantes. Mais de 98% dos timócitos morrem por apoptose, porque os recetores da célula T (TCR) não reconhecem as moléculas MHC do “próprio”.

A seleção positiva ocorre na região cortical do timo e envolve a interação de timócitos imaturos e as células epiteliais do córtex. A interação entre os recetores dos timócitos e as células epiteliais, permite a aquisição de sinais protetores contra a apoptose; os timócitos cujos TCRs não se ligam às moléculas MHC não interagem com as células epiteliais e não recebem o sinal protetor, sendo eliminadas por apoptose. A seleção positiva é responsável pela criação de um repertório de linfócitos T restritos às moléculas MHC do “próprio”.

A população de timócitos que sobrevive à seleção positiva inclui células com baixa e alta afinidade para auto-antígenos apresentados por moléculas MHC “próprio”, e que são submetidos à seleção negativa. Através da interação de células do estroma do timo, células dendríticas (DC) ou macrófagos, os timócitos com TCRs com muita afinidade são eliminados por apoptose, evitando a maturação de LT auto-reativos (Souza, et al., 2010). No entanto, alguns timócitos

com alta/média afinidade sobrevivem, levando à geração de células T reguladoras, interveniente na **tolerância periférica** (Liu, 2006).

Idealmente, os linfócitos T maduros originados no timo deverão ser reativos para antígenos estranhos mas tolerantes aos “próprios” (Arosa, et al., 2007). Apesar do processo de seleção positiva e negativa, diversos estudos confirmam que células auto-reativas estão presentes em indivíduos saudáveis, e que podem ser isoladas do sangue ou em tecidos linfóides periféricos, sem que estes desenvolvam patologias auto-imunes (Burns, et al., 1983; Cruvinel, et al., 2008; Sakaguchi, et al., 2010; Dejaco, et al., 2005). Logo, os mecanismos responsáveis pela tolerância central apresentam falhas, sendo implícito a existência de um segundo mecanismo que assegura o controlo das células auto-reativas com potencial auto-imune na periferia, responsável pela eliminação ou modelação de células maduras reativas em células anérgicas.

Nas doenças de natureza auto-imune verifica-se a perda da capacidade do sistema imunológico em distinguir o “próprio” do “não próprio”. O sistema imunitário passa a atuar contra auto-antígenos, conduzindo à destruição dos próprios tecidos, à exposição de auto-antígenos e produção de citocinas pró-inflamatórias. Estas doenças são muitas vezes caracterizadas pela presença de elevados títulos de anticorpos anti-nucleares, bem como auto-anticorpos órgão específicos (Cruvinel, et al., 2008).

1.3 Células T Reguladoras

A evidência de que os timócitos estão envolvidos na prevenção de doenças auto-imunes foi descrita por Nishizuka e Sakakura em 1969 (Nishizuka & Sakakura, 1969). Estudos experimentais com ratos timectomizados no período neonatal (2 a 4 dias de vida), demonstraram que a timectomia precoce originava o desenvolvimento de auto-imunidade, através da produção de auto-anticorpos específicos, anti-ovócitos, desenvolvimento de disgenesia do ovário e esterilidade precoce.

Apesar da tolerância central a antígenos do epitélio do timo ser um processo dominante na regulação da resposta imune, no início dos anos 70,

Gershon e Kondo postularam a existência de uma população de células T periférica capaz de suprimir outras células do sistema, de forma antígeno-específica (Gershon & Kondo, 1970). Em 1972, com a publicação de um artigo onde são designadas por “células T supressoras”, passa a ser considerada a hipótese de que para além da seleção tímica, possa existir um mecanismo suplementar de regulação, mediado por linfócitos periféricos, com função bivalente de estimulação e/ou inibição da resposta imune.

As células T reguladoras emergem como responsáveis pelo controlo de uma variedade de respostas imunes fisiológicas e patológicas, incluindo a inibição de doenças auto-imunes (Sakaguchi, et al., 2006). Porém, durante vários anos, não foram desenvolvidos trabalhos relativos a este tema, devido a vários problemas técnicos, nomeadamente a inexistência de marcadores específicos que possibilitassem a identificação das Treg (Faria, et al., 2008; Leipe, et al., 2005).

A função reguladora de subpopulações de linfócitos T $CD4^+$ foi demonstrada por Sakaguchi e colaboradores (Sakaguchi, et al., 1995). Estes autores verificaram, em modelos experimentais, que a eliminação de esplenócitos $CD25^+$ em roedores saudáveis desencadeava distúrbios auto-imunes, e a transferência desse tipo de células revertia essas mesmas manifestações (Figura 1). Posteriormente, verificou-se que a depleção destas células estava também associada à quebra de tolerância feto-materna, ao desenvolvimento de doenças alérgicas e à diminuição da atividade imune anti-tumoral com consequente desenvolvimento de neoplasias (Sakaguchi, et al., 2006).

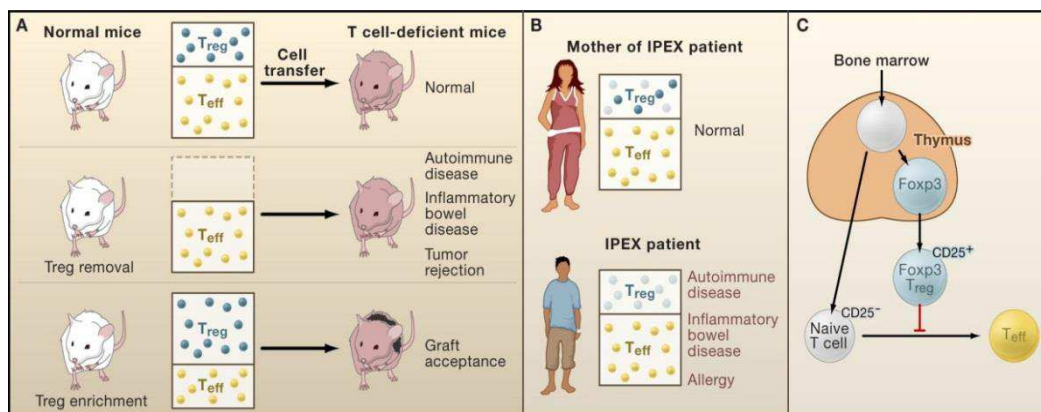


Figura 1 -- Efeito da deficiência das Treg em Humanos e modelo animal. (A) -- De uma suspensão de células T, originárias de um ratinho normal, são eliminadas as Treg (CD4⁺CD25⁺) e transferidas para um timotizado. Imediatamente, o recipiente desenvolve síndromes auto-imunes, IBD e observa-se uma rejeição de células tumorais. Em contraste, quando as Treg são enriquecidas e transferidas, verifica-se uma aceitação de aloenxertos por parte do rato recipiente. (B) – Criança de sexo masculino atingida pelo síndrome ligado ao cromossoma X caracterizados por desregulação imune poliendocrinopatia (IPEX). Mãe portadora da mutação do gene FoxP3, heterozigótica ligada ao cromossoma X, pode apresentar um número reduzido de Treg normais ou uma mistura de Treg normais (círculos azuis escuros) com Treg disfuncionais (círculos azuis claros). (C) -- O timo normal produz Treg naturais que expressam FoxP3. A actividade supressora das Treg recai principalmente sobre as células T efectoras (Teff), originárias de células T virgens (Adaptado de Sakaguchi, et al., 2008).

Em 2001, as células T reguladoras, foram isoladas e caracterizadas como sendo LT CD3⁺CD4⁺CD25⁺ por vários grupos de investigação (Hafler, et al., 2010; Borrego, et al., 2007). Este achado foi decisivo, porque permitiu o isolamento físico das Treg dos outros tipos de linfócitos CD4⁺, cultura e análise dos mecanismos de imunossupressão.

Godfrey e colaboradores, demonstraram que mutações no gene FoxP3 podem originar a doença linfoproliferativa fatal e que esta é mediada por linfócitos T CD4⁺, sendo o fator de transcrição FoxP3 o responsável pela diferenciação de células T naíve em Treg (Godfrey, et al., 1991). Posteriormente, foram desenvolvidos anti-FoxP3, possibilitando a identificação das Treg por CMF, método atualmente utilizado para análise destas células.

1.3.1 Populações de Células T Reguladoras

Qualquer célula com capacidade de regular respostas imunes é considerada célula T reguladora. Estas foram largamente designadas por: células T reguladoras naturais e induzidas ou adaptativas.

Segundo dados publicados, as células T reguladoras de origem tímica ou reguladoras naturais (**nTreg**) têm como principal função a supressão de respostas imunes auto-reativas; enquanto que as subpopulações de Treg adaptativas, têm origem periférica e atuam no controlo homeostático de respostas imunes adquiridas (Schwarz, & Schwarz, 2006) (Figura 2).

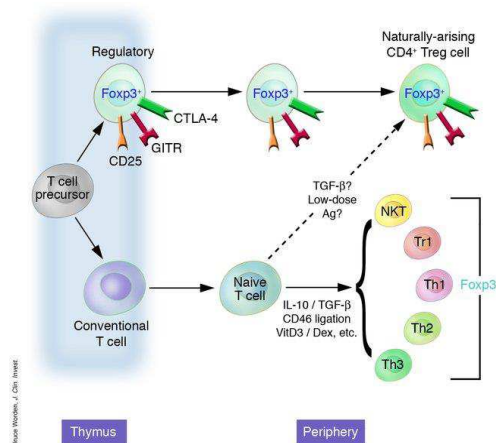


Figura 2 -- Subpopulações de células T reguladoras e seus precursores. As Treg de origem tímica resultam de combinações via TCR e sinais co-estimulatórios, chegando à periferia completamente funcionais. A contrastar, as Treg induzidas -- por exemplo Tr1 e TH3 -- adquirem a sua condição de células reguladoras na periferia (Adaptado de Fehérvári & Sakaguchi, 2004).

As células T reguladoras induzidas classificam-se de acordo com o seu mecanismo de ação:

- **TR1** -- produzem níveis elevados de IL-10, e suprimem a proliferação de células T CD4⁺ em resposta a antígenos. A função supressora destas células está bem documentada nas doenças alérgicas;
- **TH3** -- descritas em 1994 por Chen e colaboradores (Borrego, et al., 2007) como sendo linfócitos T CD4⁺ induzidos nos gânglios linfáticos após estimulação com antígenos ingeridos e cujo principal

mecanismo de ação é a produção de citocinas com ação imunossupressora (TGF- β , L-10);

- Algumas células **CD4⁻CD8⁻** e **CD8⁺CD28⁺**, que adquirem função reguladora após estimulação com antígenos específicos, na presença de citocinas específicas (Sakaguchi et al., 2010);
- **Células Natural Killers (NK)** – produtoras de grande quantidade de IL-4 e de IFN- γ , após ativação celular (Borrego, et al., 2007).

1.3.2 Caracterização fenotípica e funcional das Treg

As células T reguladoras naturais são capazes de suprimir a ativação e expansão de células T auto-reativas. Também exercem a sua função sobre outras células, nomeadamente dos linfócitos T CD8⁺, linfócitos B, macrófagos, monócitos, células dendríticas, e possivelmente sobre as células NK e células T NK (NK/T), inibindo a sua ativação, proliferação e/ou função efetora, e desta forma modular a resposta imune inata e adaptativa.

As nTreg, representam cerca de 5-10% da população de linfócitos T CD4⁺ periféricos. São produzidas nos corpúsculos de Hassal no timo normal como uma linhagem especializada, independente da exposição a antígenos externos (Baccher-Allan, et al., 2001; Boissier, et al., 2008). As células T duplamente negativas (CD4⁻CD8⁻) tornam-se duplamente positivas após a interação do TCR com o complexo MCH-peptídeo. É na região medular do timo que as células progridem para CD4⁺CD8⁻ ou CD4⁻CD8⁺, e é também nesta região que ocorre a seleção dos LT CD4⁺CD25⁺ (Figura 3). Segundo Lisbon e colaboradores o desenvolvimento das Treg ocorre em dois passos: a interação do TCR com o complexo MCH II-peptídeo próprio, seguido da exposição do ligando B7 e as citocinas com a cadeia γc , especialmente a IL-2; A indução de FoxP3 pode requerer a ligação CD28. É na periferia que as Treg realizam a sua função, estando sujeitas a mecanismos homeostáticos, os quais dependem de três fatores: IL-2, TGF- β e a ligação com CD28 (Lisbon & Rudensky, 2007).

A cadeia α do receptor da IL-2 (CD25) é um marcador de superfície que identifica linfócitos T ativados com ação direta na tolerância periférica. A IL-2 e o CD25 induzem a proliferação das Treg contribuindo para a sua eficiência e aptidão na periferia (Nandakumar, et al., 2009; Borrego, et al., 2007). Mutações ou polimorfismos nos genes que codificam estas moléculas são responsáveis pela predisposição para doenças auto-imunes, tanto em roedores como em humanos (Sakaguchi, et al., 2006).

Foi identificado um número considerável de outros marcadores de superfície expressos pelas Treg (Figura 4):

- CTLA-4;
- CD62 ligando;
- CD134 (OX40);
- GITR;
- TGF- β ;
- CD9;
- PD-L1;
- Integrina $\alpha 4\beta 7/\alpha 4\beta 1$.

Tal como o CD25 que pode ser expresso em mais de 20% de células T convencionais ativadas no sangue periférico (Seddik, et al., 2006), também estes marcadores podem ser expressos por outras células, o que limita a sua utilização para identificar e isolar as Treg (Dejaco, et al., 2005).

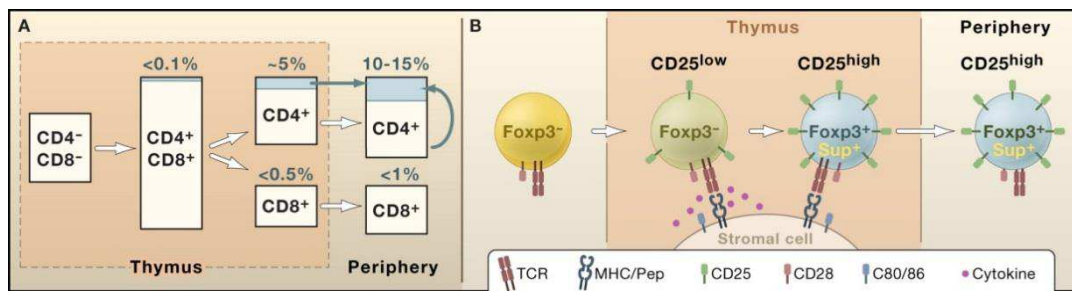


Figura 3 -- Desenvolvimento timico das células FoxP3⁺. (A) -- Composição percentual de células FoxP3⁺ nas diferentes subpopulações de timócitos. Na periferia, células CD4⁺ não reguladoras, em determinadas condições, podem diferenciar-se em Treg FoxP3⁺. (B) -- O desenvolvimento das Treg no timo requer a interação entre as células do estroma e várias moléculas. O programa de diferenciação em Treg inicia-se com a interação entre TCR, o complexo MHC-peptídeo próprio e células do estroma do timo, com a intervenção de moléculas acessórias e os seus ligandos (CD28 e CD80 ou CD86 respetivamente), ou via derivados das células do estroma (citocinas) (Adaptado de Sakaguchi et al., 2008).

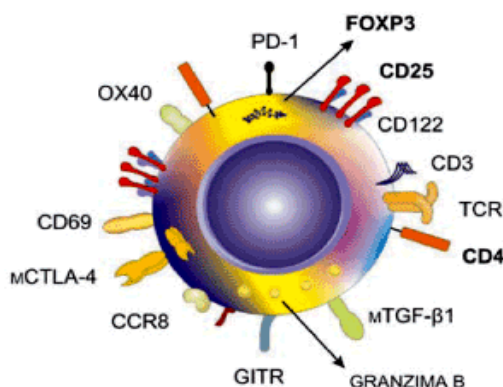


Figura 4 -- Expressão fenotípica da célula T reguladora de origem tímica (Adaptado de Cruvinel, et al., 2008).

O modo de funcionamento das Treg tem sido objeto de estudo de numerosos trabalhos de investigação na área da imunologia e muitos dos mecanismos envolvidos na sua ação imunomoduladora foram já identificados. Este conhecimento é de extrema importância, dadas as perspetivas da sua futura utilização como potencial terapêutica, no controlo da tolerância periférica (Vignali, 2008).

A ação supressora destas células pode ser mediada pela produção de citocinas imunossupressoras, tais como a IL-10 e TGF-β. A IL-10 inibe a ativação das células apresentadores de antígenos (APC), sendo também antagonista do

interferão gama. Através do contato celular e modificação da função ou morte das APCs a molécula CTLA-4 liberta sinais inibidores quando se liga ao recetor CD80 das DC, ou das células T ativadas (Sakaguchi, et al., 2008) (Figura 5). A expressão do recetor da cadeia alfa da IL-2 induz a morte de células efetoras: o consumo de IL-2 limita a resposta efetora das células T, levando à apoptose por privação de citocinas.

A FoxP3 controla diretamente a expressão de CTLA-4, e o seu bloqueio é suficiente para impedir a função supressora das Treg (Sakaguchi, et al., 2008). Outras moléculas de adesão de membrana, LAG-3, CD39 e CD73 também participam na supressão induzida pelas Treg.

São também de referir alguns mecanismos moleculares indicados como participantes na supressão induzida pelas Treg: transferência de cAMP para as células alvo através das “Gap-junction” e produção de granzima B e IL-10 (Miyara & Sakaguchi, 2011). Recentemente, foi demonstrado que as Treg produzem IL-35, uma citocina da família da IL-12 (Collison, et al., 2007).

A principal controvérsia relativa ao modo de atuação das Treg reside na existência de um mecanismo central, ou se estas operam de acordo com o local onde estão inseridas (Miyara & Sakaguchi, 2011). Ainda neste contexto, uma das principais características das Treg é a sua capacidade plástica, que se define pela perda da expressão de FoxP3, da atividade supressora e pela produção de citocinas pró-inflamatórias, IL-2 e INF γ (Hoffman, et al., 2009). Esta alteração fenotípica e funcional das Treg ocorre após estimulação prolongada via TCR e CD28.

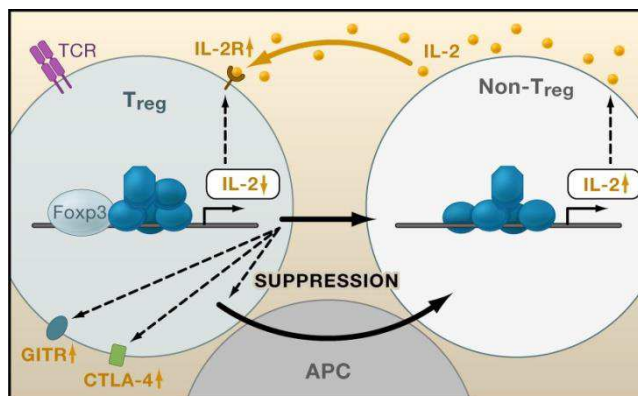


Figura 5 -- Função supressora das Treg via IL-2. Interações entre Treg, células T efectoras e APCs e o controle negativo na função supressora das Treg, via IL-2. FoxP3 e outros fatores de transcrição reprimem a transcrição de IL-2 pelas Treg, ficando dependentes da IL-2 exógena, para a sua função e manutenção, produzida essencialmente pelas células T efectoras. FoxP3 é também responsável pela ativação dos genes que codificam CD25, CTLA-4 e GITR. Moléculas que atuam diretamente sobre células T efectoras ou modelam a função das APCs (Adaptado de Sakaguchi, et al., 2008).

1.3.3 Análise por citometria de fluxo

O primeiro passo no estudo da contribuição das Treg nas doenças de foro auto-imune será a sua quantificação, averiguando se o seu número está diminuído ou aumentado em doentes, quando comparado com controlos saudáveis. No entanto, esta quantificação, até aos nossos dias, levanta ainda algumas dificuldades técnicas.

Inicialmente, as Treg foram definidas como sendo os LT $CD4^+$ com a expressão mais forte em $CD25$ ($CD25^{++}$). Em citometria de fluxo, esta caracterização fenotípica acarreta alguma subjetividade: a expressão do marcador $CD25$ é contínua, dificultando a definição da fronteira entre as células $CD25^+$ e $CD25^{++}$. Por esta razão, alguns autores defendem que apenas a percentagem de ~1-2% de células $CD25^{++}$ podem, efetivamente, serem contabilizadas como Treg. Contudo, recentemente, a descoberta de que a população das Treg seria constituída por células naïve e de memória, veio contrariar este critério.

As Treg foram divididas, em dois subgrupos mais homogêneos, distintos funcional e fenotipicamente:

- Treg de memória -- com a expressão de $CD25^{++}CD127^{+/-}CD45RO^{+}FoxP3^{+}$;
- Treg naïve -- com a expressão de $CD25^{+}CD127^{+/-}CD45RA^{+}FoxP3^{+}$ (Hafler, et al., 2010).

Pensa-se que as Treg de memória serão as células reguladoras que têm sido alvo de estudos desde 2001, sendo apenas uma fração da população completa das mesmas. São caracterizadas por níveis elevados de CD25, FoxP3 e outros marcadores de ativação celular, exibem uma elevada capacidade de supressão e quando estimuladas via TCR sofrem apoptose (Miyara et al., 2009; Levings, et al., 2001; Ashley & Baecher-Allan, 2009; Vukmanovic-Stejic, et al., 2006). Ou seja, as Treg definidas como uma subpopulação de $LT\ CD4^{+}CD25^{++}FoxP3^{+}$ estariam a ser subquantificadas.

Ao longo desta última década, foram elaborados vários trabalhos com o objetivo de quantificar as Treg no sangue periférico em vários doentes com diferentes patologias auto-imunes. Como pode ser visto na Tabela 1, a imunofenotipagem das Treg varia de autor para autor mesmo dentro da mesma patologia, o que, invariavelmente, leva a resultados díspares. A heterogeneidade dentro desta população poderá também ele ser um fator a contribuir para a incongruência de resultados, assim como o critério restrito da utilização de $CD25^{++}$, que poderá excluir a subpopulação recentemente identificada com o fenótipo $CD25^{+}CD127^{+/-}CD45RA^{+}FoxP3^{+}$ - Treg naïve. Interessantemente, apesar da proteína FoxP3 ser o marcador major das Treg, a sua utilização nos protocolos em CMF deve ser cautelosa, nem todas as células que expressam a molécula são Treg.

A procura de novos marcadores para as células T reguladoras, para além dos já existentes, deveu-se à necessidade de realizar estudos funcionais às células isoladas nos estudos quantitativos. A marcação com FoxP3 inutiliza as células para estudos funcionais e expansão para futuras utilizações terapêuticas.

Tabela 1 -- Prevalência e funcionalidade das Treg em doenças auto-imunes (Miyara, et al., 2011).

Doença	Fenótipo das Treg	Prevalência das Treg na periferia	Função das Treg na periferia	Autor	Ano
Artrite Reumatóide					
	CD4 ⁺ CD25 ^{high}	Diminuída	Não testada	Cao	2004
	CD4 ⁺ CD25 ^{high}	Diminuída	Não testada	Lee	2008
	CD4 ⁺ CD25 ⁺	Normal	Não testada	Liu	2004
	CD4 ⁺ CD25 ⁺	Normal	Normal	Liu	2005
	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ / ⁺ FoxP3 ⁺	Normal	Não testada	Aerts	2008
	CD4 ⁺ CD25 ^{high}	Aumentada	Normal	Han	2008
	CD4 ⁺ CD25 ^{high}	Diminuída	Não testada	Sempere-Ortels	2009
	CD4 ⁺ CD25 ^{high}	Aumentada	Não testada	Kao	2007
Lúpus Eritematoso Sistêmico					
	CD4 ⁺ CD25 ^{high}	Diminuída	Normal	Miyara	2005
	CD4 ⁺ CD25 ^{high} FoxP3 ⁺	Diminuída	Não testada	Barath	2007
	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻	Diminuída	Não testada	Yang	2009
	CD4 ⁺ CD25 ^{high}	Normal	Comprometida	Alvarado-Sanchez	2008
	CD4 ⁺ CD25RA-FoxP3 ^{high}	Diminuída	Não testada	Miyara	2009
	CD4 ⁺ CD25RA+FoxP3 ^{+/+}	Aumentada	Não testada	Miyara	2009
	CD4 ⁺ CD25 ^{high} FoxP3 ⁺	Aumentada	Normal	Venigalla	2008
Síndrome Primário Sjögren					
	CD4 ⁺ CD25 ^{high}	Diminuída	Não testada	Liu	2008
	CD4 ⁺ CD25 ^{high}	Normal	Não testada	Miyara	2005
	CD4 ⁺ FoxP3 ⁺	Normal	Não testada	Christodoulou	2008
	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{-/+}	Normal	Não testada	Christodoulou	2008
	CD4 ⁺ CD25 ^{high}	Aumentada	Normal	Gottenberg	2005

1.3.3.1 FoxP3

A proteína FoxP3 é constituída por 431 aminoácidos, sendo codificado pelo gene FoxP3, formado por 11 exons, localizado no braço curto do cromossoma X, e é expresso predominantemente nas células do timo, baço, gânglios linfáticos e pelas células T $CD4^+CD25^+$. Mutações no gene FoxP3 são responsáveis pelo défice ou disfunção das células nTreg $CD4^+CD25^+$ e a causa da síndrome humana IPEX “Immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome”, que se caracteriza por um conjunto de manifestações auto-imunes graves, incluindo diarreia, eczema, diabetes com destruição das glândulas endócrinas e tiroidite. Esta doença congénita afeta crianças do sexo masculino e é na maioria dos casos letal, antes dos 2 anos de idade.

A FoxP3 é o marcador major das nTreg, envolvido na regulação de vários genes ligados à função e modo de atuação das Treg: CD25, GITR e CTLA-4, (Marson, et al., 2007). Contudo, mais recentemente observou-se que o mRNA e a proteína FoxP3 são também expressos por células T ativadas, sem atividade supressora e que é possível induzir a expressão de CD25 e FoxP3 em células T naïve, o que dificulta a sua identificação (Gavin, 2006). Estes resultados levantaram questões relativas à utilização da expressão da FoxP3 nos linfócitos T, para a correta identificação das Treg (Walker, et al., 2003; Morgan, et al., 2005). Existem, no entanto, diferenças na estabilidade e expressão de FoxP3, mais estável e de maior intensidade nas nTreg (Zheng & Rudensky, 2007).

Apesar das diferenças de expressão existem outras limitações da utilização da expressão de FoxP3 como marcador específico:

- A aquisição da expressão de FoxP3 pelas células T ativadas não confere capacidade reguladora (Tran, et al., 2007; Miyara, et al., 2009);
- Em determinadas condições é possível que as células imunossupressoras percam a capacidade reguladora;
- A localização da proteína FoxP3 é intracelular, o que inviabiliza estudos funcionais e de expansão celular (Esensten, et al., 2009).

Atualmente, alguns autores defendem que a marcação deve basear-se no estado de metilação do locus de FoxP3 no DNA em detrimento da expressão da

proteína (Floess, et al., 2007; Wieczorek, 2009). Porém, este método não está ainda implementado na prática clínica.

1.3.3.2 IL-7R α (CD127)

Liu e colaboradores combinaram expressão gênica com citometria de fluxo, e verificaram que a expressão do mRNA das células CD4⁺CD25⁺⁺ e das CD4⁺CD25⁻ diferia em alguns genes. Entre eles, o gene do IL-7R tinha uma expressão 2,4X mais baixa nas células CD4⁺CD25⁺⁺ quando comparado com as CD4⁺CD25⁻. Estes resultados foram replicados pelo método da PCR e por CMF, confirmando a relação inversa entre CD127 e CD25 (Liu, et al., 2006).

Em conjunto com a expressão forte de CD25, as Treg são caracterizadas pela expressão fraca de CD127 (IL-7R α) em comparação com as células T convencionais. Apesar da expressão e consequente sinalização de IL-7/IL-7R se apresentar como crucial para a maior parte das células T periféricas, as Treg são uma exceção. A IL-2 é o principal fator de sobrevivência, enquanto a IL-7 contribui moderadamente para o equilíbrio das Treg (Mazzucchelli, et al., 2008; Peffault de Latour, et al., 2006; Bayer, et al., 2008).

A Figura 7 mostra uma inversão entre a expressão de FoxP3 e CD127, sugerindo uma regulação do fator transcrição FoxP3 sobre CD127, o qual também atua sobre outros genes responsáveis pela função e modo de atuação das Treg. Uma análise da expressão de FoxP3 em células com expressão positiva e negativa para CD127, revelou que grande parte das células “caia” na região com expressão CD127^{-low} (Liu, et al., 2006). Estava assim encontrado um novo marcador para as Treg, com o potencial de substituir a marcação com FoxP3, a qual nem sempre se relaciona com a expressão de CD25 (Figura 6).

A introdução de CD127 na fenotipagem das Treg em conjunto com CD25 aumentou o grau de pureza da população de Treg, com uma elevada capacidade supressora, para 98% (Seddik, et al., 2006). O trabalho conduzido por Liu e colaboradores permitiu observar que as células $CD4^{+}FoxP3^{+}$ eram do subtipo $CD25^{++} CD127^{-/low}$ e que a FoxP3 atua no promotor de CD127, reprimindo a sua função, contribuindo assim para a expressão reduzida de CD127 nas Treg (Liu, et al., 2006).

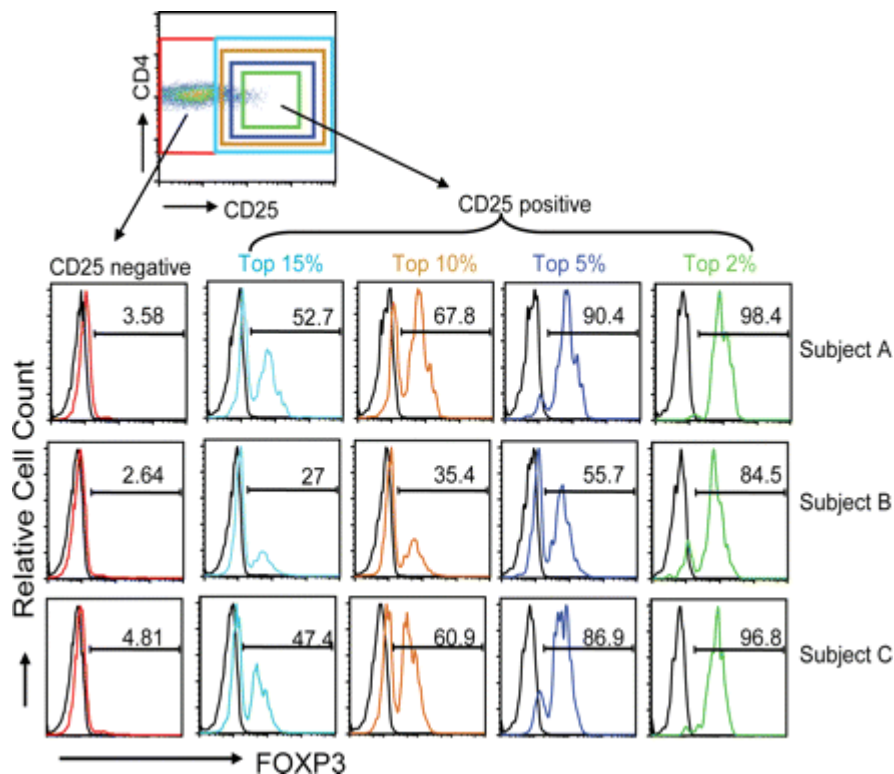


Figura 6 -- Expressão de FoxP3 em percentagens significativas de $CD4^{+}$ independentemente da expressão de CD25. Apesar de a maioria das células $CD4^{+}CD25^{++}$ expressarem FoxP3 (84,5 – 96,8%), um número considerável de células FoxP3⁺ eram negativas ou DULL para CD25. De fato, se a expressão de FoxP3 for retirada de todas as células que marcam CD25, independentemente dos níveis de expressão, entre 27% a 52,7% das células CD25 são FoxP3⁺ (Adaptado de Liu, et al., 2006).

A marcação com CD127 elevou a qualidade dos protocolos em citometria de fluxo, assim como os simplificou. A marcação com anti-CD127, contrariamente à marcação intracelular com anti-FoxP3, é de superfície, tendo a vantagem de não interferir com a morfologia celular, de mais rápida execução, bem como mais acessível em termos financeiros para o laboratório, mas mais importante para o estado/utente.

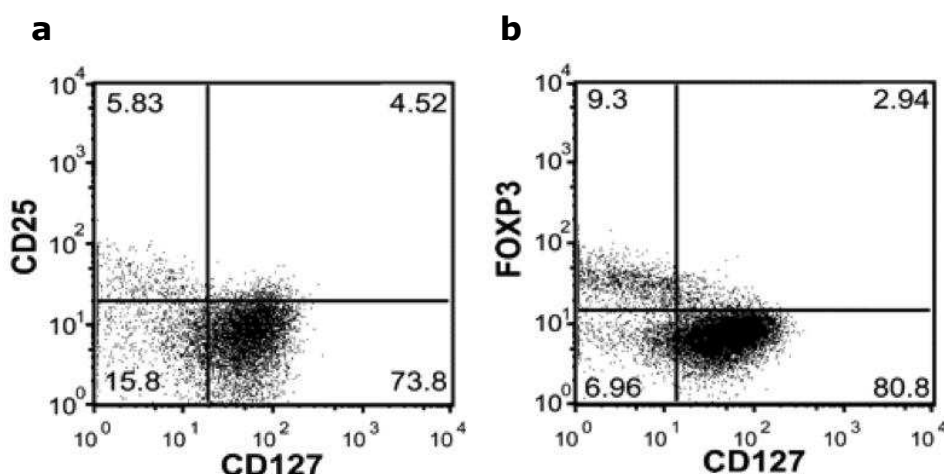


Figura 7 -- Expressão de FoxP3 nos diferentes subgrupos de células T humanas CD4⁺CD127^{+/-}. A maior parte das células CD4⁺CD25⁺, especialmente as células com expressão forte de CD25, expressam níveis baixos de CD127 (a). Mais importante, a análise por citometria de fluxo da expressão de FoxP3 nas células T CD127^{+/-} e CD127⁺, revelou que a maior percentagem de células T FoxP3⁺ são CD127^{+/-} (b) (Adaptado de Liu, et al., 2006).

1.4 Artrite Reumatóide

As células T reguladoras estão profundamente envolvidas na prevenção da auto-imunidade na periferia, bem como no controlo de uma variedade de respostas imunológicas. Na última década, foi possível desvendar algumas características quantitativas e qualitativas das Treg através da utilização de protocolos com CD25, CD127 e FoxP3, como se referiu.

Para além da validação da metodologia, que irá permitir avançar com estudos quantitativos das Treg no sangue periférico pelo Serviço de Imunologia do Centro Hospitalar do Porto, o projeto teve como objetivo a caracterização

quantitativa das Treg no sangue periférico de doentes com AR diagnosticada, e sua comparação com valores obtidos de dadores saudáveis.

Devido às características inerentes de um Hospital central, os doentes com AR incluídos neste estudo, encontravam-se medicados com Rituximab.

Rituximab é um anticorpo monoclonal quimérico (murino-humano), específico para o antígeno de superfície CD20 expresso apenas por linfócitos B, (Wilk, et al., 2009) e seus precursores, e que não circula no plasma como antígeno livre. Biologicamente, é muito eficaz na eliminação de linfócitos B normais e malignos, podendo interferir na produção de anticorpos patológicos contra antígenos eritrocitários e plaquetários, relacionando-se com a diminuição do estado inflamatório e atividade da doença. Pode induzir a morte de células CD20⁺ por vários mecanismos: citotoxicidade anticorpo dependente, lise via complemento e indução de apoptose (Vigna-Pérez, et al., 2006).

A AR é uma doença auto-imune, que afeta principalmente o sexo feminino com idades compreendidas entre os 40 e 60 anos. É caracterizada por inflamação crónica e destruição da arquitetura das articulações (Cruvinel, et al., 2008), afeta frequentemente o sistema respiratório, hematológico e cardiovascular. Muitos indivíduos com AR produzem um tipo de auto-anticorpos denominado por Fator Reumatoide (FR), reativos com a região Fc do IgG. O FR clássico é do tipo IgM e tem a capacidade de se ligar a IgGs normais circulantes formando complexos IgM-IgG, que se depositam nas articulações. Estes complexos podem ativar a cascata do complemento, provocando uma reação hipersensível do tipo III, que tem como resultado a inflamação crónica das articulações. A progressão pode ser muito rápida, sendo caracterizada pelo inchaço do sinóvio e destruição da cartilagem e osso circundante. Qualquer articulação pode ser afetada, embora normalmente tem início nas mãos, pés e pulsos, sendo desde cedo muito limitadora. A etiologia da AR e o seu desenvolvimento ainda não foram identificados, mas a presença de citocinas inflamatórias poderá ter um papel chave na indução e manutenção da doença (Anderson & Isaacs, 2008).

O principal objetivo para doentes que sofrem de AR, e outras doenças auto-imunes, é a restauração da função normal imunológica, relegando para

segundo plano tratamentos imunossupressores com múltiplos efeitos secundários (Esensten, et al., 2009).

A forte investigação que recai sobre as células T reguladoras deve-se ao fato destas serem um forte candidato para terapias duradouras e remissão de doenças auto-imunes e inflamatórias. Investigadores e clínicos esperam, que a utilização das Treg ou agentes imunomoduladores iram permitir utilizar terapias de curta duração que levarão à inibição de auto-imunidade por longos períodos, restabelecendo o número ou/e função das Treg sem bloquear as respostas imunes protetoras contra infecções.

Sobre o potencial das Treg no tratamento das doenças auto-imunes, e em particular na AR, existe um longo caminho a percorrer. No entanto, existem já alguns fármacos aprovados, outros em fase experimental com efeitos sobre o número das Treg, assim como terapia celular em fase de ensaio clínico.

Uma das dificuldades na utilização das Treg para terapia celular é a sua expansão. A expansão, in vitro, tem de obedecer a condições muito controladas para garantir a preservação da capacidade supressora. A expansão ex vivo e a sua re-infusão têm, com sucesso, prevenido ou revertido algumas doenças auto-imunes em modelos animais, incluindo modelos com Artrite Inflamatória (AI). Apesar de bons resultados em modelos animais, dados mais recentes sugerem que algumas Treg completamente diferenciadas podem ser instáveis, adquirindo o fenótipo de células T de memória e capazes de produzir IFN- γ e IL-1. Logo, uma contaminação das Treg terapêuticas com Treg instáveis teria como resultado não uma atenuação da doença mas sim uma exacerbação. Um outro ponto crucial na terapia celular com Treg policlonais, poderá ser uma imunossupressão generalizada, aumentando a susceptibilidade para infecções (Esensten, et al., 2009).

1.4.1 Quantificação e Funcionalidade das Treg em Doentes com AR

Alguns trabalhos têm sido conduzidos com o propósito de avaliar o papel das Treg na AR, os quais nem sempre com resultados concordantes, como mostra a Tabela 1. No entanto, grande parte dos estudos realizados reportam

número mais baixo ou normal de Treg definidas como $CD4^+CD25^{+/-}$ ou $FoxP3^+$ embora também surjam resultados com valores superiores ao normal (Miyara & Sakaguchi, 2011). Em comum, todos os estudos demonstram um aumento de Treg nas articulações inflamadas, e globalmente, a função das Treg está comprometida (Boissier, et al., 2009). A divergência de resultados encontrada em vários trabalhos poderá dever-se a alguns pontos já mencionados.

Alguns autores sugerem que as Treg de doentes com AR expressam baixos níveis de CTLA-4, a qual está diretamente ligada à capacidade diminuída de atuar sobre as principais citocinas pró-inflamatórias produzidas pelas células T efectoras, TNF e $IFN-\gamma$ (Ehrenstein, et al., 2004). O que poderá estar em causa será não apenas a função comprometida das Treg, mas também a resistência à supressão adquirida pelas células T efectoras. O paradigma poderá estar no equilíbrio entre a população de Treg, a população de células T efectoras e as células T pró-inflamatórias, designadas por Th17 e Th1 (Boissier, et al., 2008). Possivelmente, porque a ação supressora das Treg é superada por células T com sinais de forte ativação presentes nesses locais (Ehrenstein, et al., 2004).

1.5 Objetivos

Com o presente trabalho pretendemos obter um protocolo padronizado para a quantificação das células T reguladoras no sangue periférico, sendo assim possível iniciar o estudo da prevalência das Treg em doentes com AR

Os objetivos são os seguintes:

1. Elaborar um protocolo para citometria de fluxo, de plataforma única, com marcação de superfície com CD4, CD25 e CD127, e marcação intracelular com FoxP3;
2. Analisar e comparar as percentagens obtidas para as células T reguladoras obtidas a partir de diferentes estratégias citométricas;
3. Obter valores de referência para a população de Treg através da utilização de dadores saudáveis;
4. Estudar quantitativamente as Treg em doentes com AR diagnosticada.

2 Materiais e Métodos

2.1 Amostragem

O projeto inclui 27 amostras de sangue periférico de dadores saudáveis, com idades compreendidas entre os 33 e 63 anos, dos quais 13 eram do género feminino e 14 masculino, fornecidos pelo Serviço de Hematologia Clínica Dadores de Sangue do Centro Hospitalar do Porto - Hospital Santo António. As 11 amostras de doentes com AR diagnosticada, com idades compreendidas entre 35 e 75 anos, dos quais 8 eram do género feminino e 3 masculino, pertenciam a utentes anónimos, encaminhados para a consulta de Reumatologia do Centro Hospitalar do Porto. Todas as amostras foram recolhidas em tubo de vacum de 3mL, EDTA K3 da vacuette.

Foi deliberado pela Comissão de Ética que a realização do estudo não necessitava do consentimento informado dos doentes.

2.1.1 Reagentes

Os anticorpos humanos utilizados foram: anti-CD4 conjugado com ECD, anti-CD25 conjugado com FITC, anti-CD127 conjugado com CY5, utilizados para marcação de superfície e fornecidos pela Beckman Coulter. O anticorpo anti-FoxP3 conjugado com PE foi fornecido pela eBioscience. Para a marcação intracelular utilizou-se: Flow Cytometry Staining Buffer, RBC Lysis Buffer e FoxP3 Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent, adquirida à eBioscience assim como o kit de permeabilização, utilizado para marcação intracelular foi fornecido pela eBioscience.

2.1.2 Procedimento Técnico das Amostras

Todas as amostras foram sujeitas ao mesmo procedimento técnico, tal como detalhado abaixo:

1. 100µl de sangue periférico foram corados/marcados com 10µl de anti-CD4 ECD, 10µl de anti-CD127 CY5 e 5µl de anti-CD25 FITC em simultâneo e colocados a incubar durante 15 minutos ao abrigo da luz.
2. Realizou-se a lise eritrocitária com 2-3mL de RBC lysis buffer durante 1 minuto, à temperatura ambiente, seguida de centrifugação e remoção de sobrenadante.
3. Centrifugação 1600 rotações/min – Centrífuga Hettich Rotina 35R - a 4°C durante 5 minutos, permitindo a sedimentação dos leucócitos e remoção do sobrenadante por aspiração.
4. Duas lavagens com 2-3mL de FBS (Flow staining buffer) com remoção do sobrenadante, para otimizar a eliminação dos eritrócitos lisados.
5. Adição ao pellet de 1mL de solução fixação/permeabilização de trabalho seguida de incubação de 45 minutos, protegido da luz.
6. Centrifugação 1600 rotações/min – Centrífuga Hettich Rotina 35R - a 4°C durante 5 minutos, com decantação do sobrenadante.
7. Duas lavagens com 2-3mL de FBS, com rejeição do sobrenadante.
8. Adição de 5µl de anti-FoxP3 PE, com incubação no escuro, durante 30 minutos.
9. Lavagem com 2-3mL de FBS, remover sobrenadante.
10. Re-suspensão com PBS.
11. Aquisição no citómetro fluxo - Beckman Coulter Epics XL.MCL
12. A aquisição de pelo menos 10000 eventos foi realizada no gate dos linfócitos T CD4⁺

A aquisição no citómetro de fluxo foi realizada em conjunto com a Dr^a. Judite Guimarães, no Serviço de Imunologia do Hospital de Santo António.

Para contribuir para padronização do protocolo, realizamos a marcação com anti-CD127 CY5 e anti-FoxP3 PE numa só plataforma.

2.2 Leitura no Cítómetro de Fluxo

O citómetro fluxo utilizado foi o Beckman Coulter Epics XL.MCL. O controlo do equipamento obedeceu aos protocolos recomendados.

O protocolo citométrico foi desenhado tendo em conta um citograma biparamétrico de dispersão de luz frontal (FS) que define o tamanho das partículas versus a dispersão da luz lateral (SS) que define a complexidade, após definição de um gate (região) e marcação efetuada.

2.3 Análise Estatística

Para a tabulação dos dados e construção gráfica foi utilizado o programa Microsoft Excel, Microsoft Office 2007. A edição dos citogramas foi obtida recorrendo ao programa Kalusa Flow Cytometry Analysis Software versão 1.2. Os dados foram sujeitos ao teste one way ANOVA e t-student utilizando o GraphPad Prism versão 5.04 para Windows GraphPad Software San Diego California USA.

3 Resultados

3.1 Expressão dos marcadores CD25, CD127 e FoxP3

A marcação celular com CD25 e CD127 é uma simples marcação de superfície. No entanto, como a localização da proteína FoxP3 na célula é intranuclear, procedeu-se à permeabilização das amostras, a qual provoca alterações citomorfológicas. Para a aquisição correta dos linfócitos totais, contornando assim as alterações inerentes à permeabilização celular, utilizou-se a dispersão de luz frontal (FS) versus dispersão de luz lateral (SS) num citograma de contornos de densidade. Para a obtenção dos LT CD4⁺, construímos um citograma com o marcador CD4 versus SS, gateado nos linfócitos totais. Estes resultados encontram-se exemplificados na Figura 8 citograma (a) e (b).

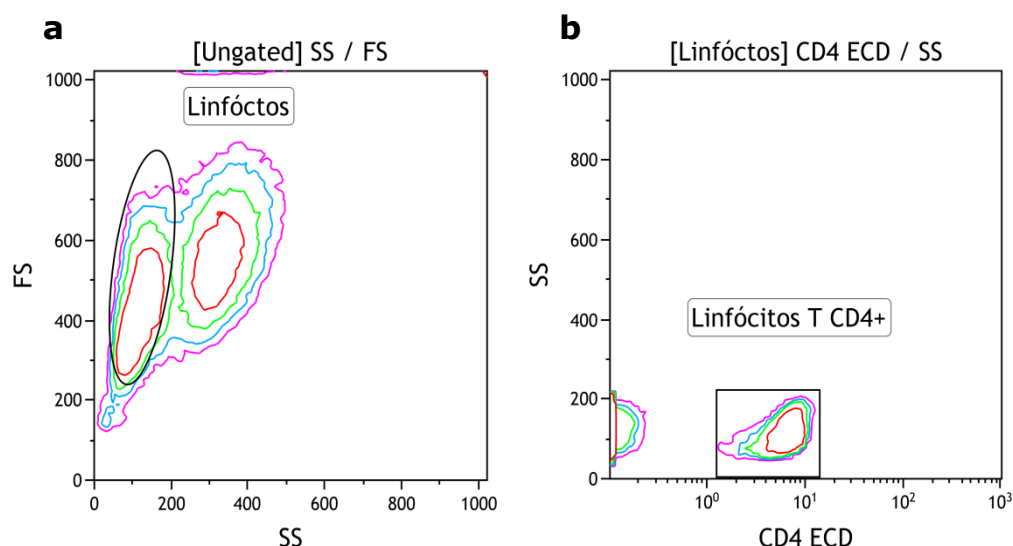


Figura 8 – (a) Citograma de contornos de densidade SS versus FS para a aquisição dos linfócitos totais. (b) Os LT CD4⁺ foram adquiridos num citograma de contornos de densidade com o marcador CD4 versus SS, a partir do gate dos linfócitos totais.

Para uma correta utilização da técnica de citometria de fluxo é necessário proceder à avaliação da expressão individual de cada marcador/fluorocromo. Sendo assim, iniciou-se o estudo com a análise da expressão das moléculas anti-CD127 PE e anti-FoxP3 CY5, com recurso a citogramas de contornos de densidade versus SS. Foi possível constatar que tanto o marcador CD127 como o FoxP3 apresentam uma expressão contínua, evidenciado na Figura 9. Na Figura 10 apresenta-se a expressão da proteína CD25 e os gates correspondentes aos 3 níveis de expressão da mesma. Estes basearam-se nas linhas de densidade, características de cada amostra.

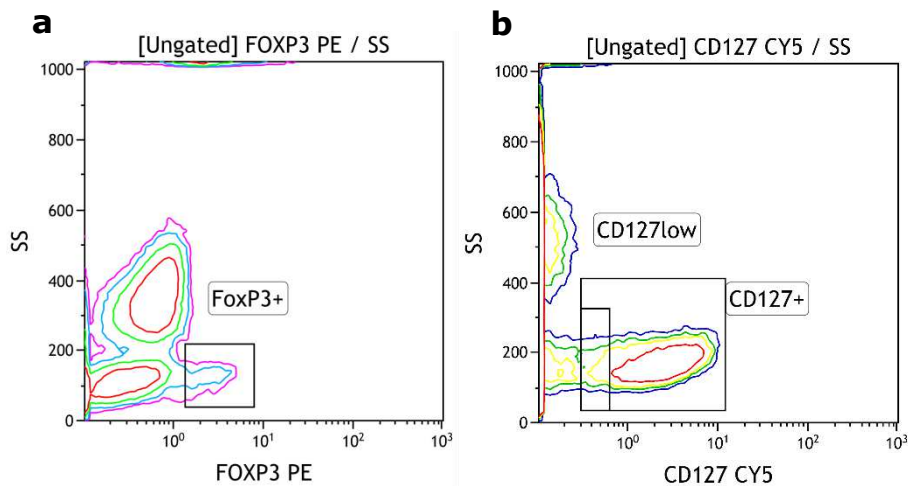


Figura 9 – Expressão dos marcadores FoxP3 PE e CD127 CY5. Para o estudo da expressão individual dos marcadores recorremos a citogramas de contornos de densidade com o respetivo marcador versus SS.

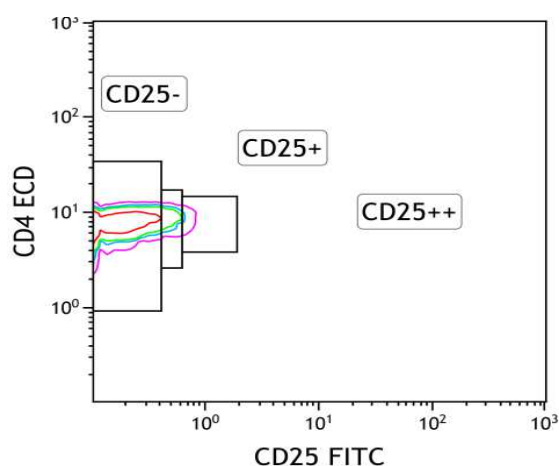


Figura 10 – Níveis de expressão do marcador de ativação celular CD25. Foram estabelecidos três níveis de expressão para o marcador CD25 a partir das linhas de densidade. CD25⁻ corresponde às células que não expressam o marcador; CD25⁺ as células que são positivas para a marcação; CD25⁺⁺ as células que são fortemente positivas na sua expressão de CD25.

3.2 Análise dos LT CD4⁺FoxP3⁺ e CD4⁺CD127^{low}

Ao longo do trabalho as Treg foram descritas como sendo LT CD4⁺ que expressam constitutivamente a molécula FoxP3. Como alternativa a esta marcação, e de acordo como trabalho de Liu e colaboradores, podem ser definidas fenotipicamente pela expressão fraca ou negativa do recetor da IL-7 (CD127) (Liu et al., 2006).

Iniciou-se a quantificação das Treg por CMF da forma mais simples, com a aquisição direta a partir do gate dos LT CD4⁺ e respetivo marcador, com a posterior caracterização com CD25, como mostram as Figuras 11 e 12.

Com esta primeira abordagem estudou-se três fenótipos com as respetivas médias:

$$\text{CD4}^+\text{FoxP3}^+ = 8,48 \pm 4,35\%$$

$$\text{CD4}^+\text{CD127}^{\text{low}} = 6,76 \pm 1,59\%$$

$$\text{CD4}^+\text{CD127}^{\text{low}} = 11,38 \pm 3,13\%$$

A análise do dot plot da Figura 11 (b) permitiu verificar que os linfócitos $CD4^+FoxP3^+$ expressavam CD25, e que uma fração dessas mesmas células eram $CD127^{-/low}$. Não obstante, para esta amostra obteve-se 7,97% de células com o fenótipo $CD25^+CD127^+$.

A utilização do marcador CD127 revelou-se mais complexa. Ao longo da análise bibliográfica constatou-se que a expressão de CD127 nem sempre é interpretada da mesma forma. Alguns trabalhos fazem referência apenas aos linfócitos com fraca expressão em CD127, contrastando com a utilização do fenótipo $CD127^{-/low}$, correspondente aos linfócitos com expressão negativa e fraca para CD127.

Procedeu-se à análise das duas subpopulações: LT $CD4^+CD127^{low}$ e $CD4^+CD127^{-/low}$, esquematizado na Figura 12. Os dois subgrupos apesar de apresentarem médias significativamente diferentes, com $P < 0,05$, eram semelhantes no conteúdo em células $CD25^+FoxP3^+$ e $CD25^+FoxP3^-$.

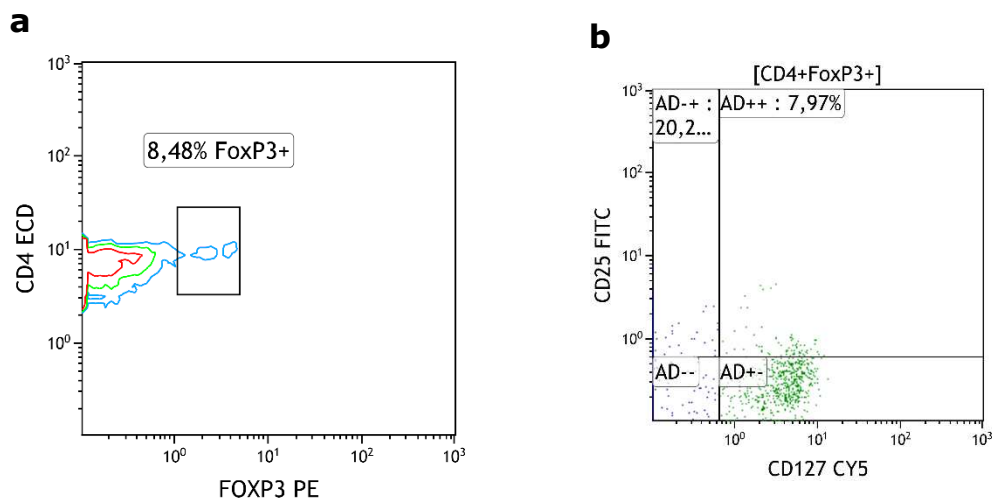


Figura 11 – (a) Expressão média de FoxP3 em linfócitos T $CD4^+$. (b) Percentagem de células $CD25^+CD127^{-/low}$ e $CD25^+CD127^+$ retirada da subpopulação $CD4^+FoxP3^+$, de um indivíduo representativo do estudo.

Com o fenótipo $CD4^+CD127^{low}$ adquiriu-se a maior percentagem de células reguladoras, com diferenças significativas, comparativamente com as percentagens obtidas com os fenótipos $CD4^+FoxP3^+$ e $CD4^+CD127^{low}$, com $P < 0,05$.

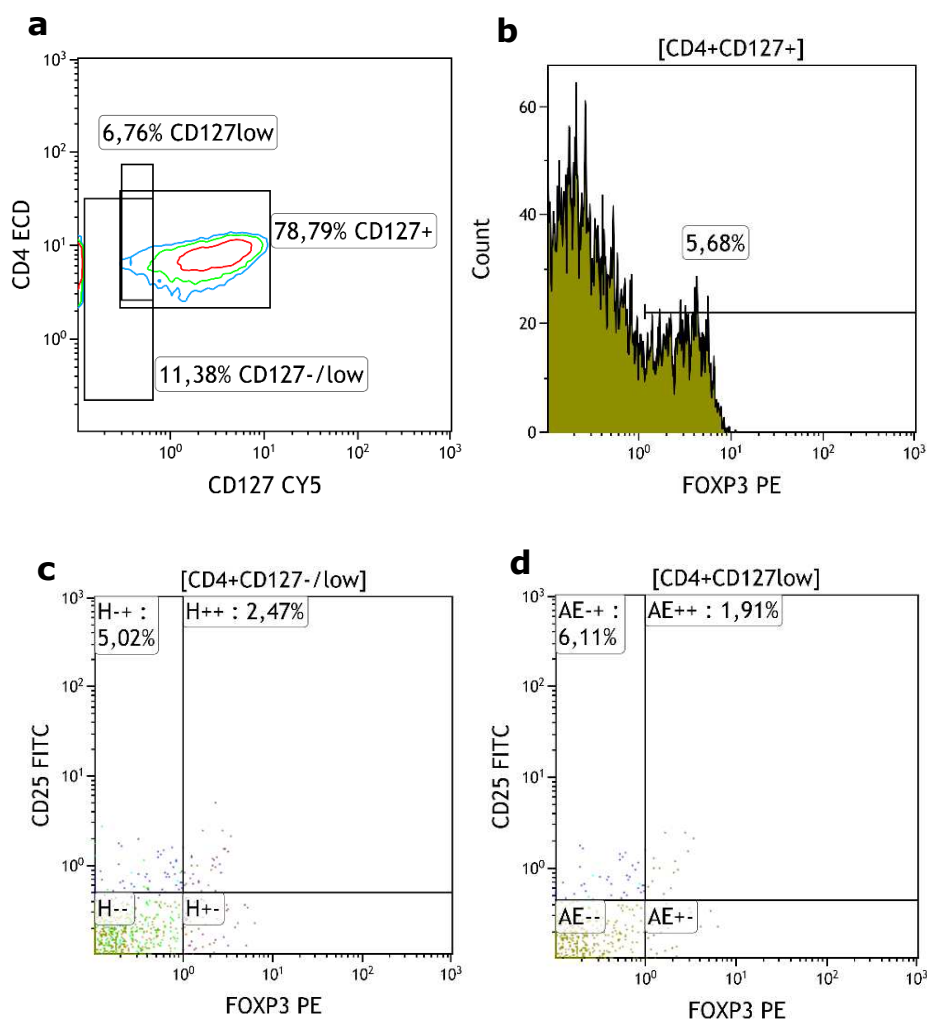


Figura 12 – (a) Expressão média de CD127 em linfócitos T $CD4^+$. (c) e (d) Percentagem de células $CD25^+FoxP3^-$ e $CD25^+FoxP3^+$ retiradas do gate da subpopulação $CD4^+CD127^{low}$, $CD4^+CD127^{low}$, respetivamente, de um dador representativo do estudo. (b) Expressão média de FoxP3 nos linfócitos T $CD4^+CD127^+$.

3.3 Relação entre os marcadores CD127, FoxP3 e CD25

Prosseguiu-se o estudo com a análise da expressão de FoxP3 e CD127 nos diferentes níveis de expressão de CD25.

Observou-se que à medida que nos aproximamos do gate dos LT CD4⁺ com expressão forte de CD25 (CD25⁺⁺), a percentagem de linfócitos que expressava CD127 decresceu. Em contraste, a percentagem dos mesmos linfócitos que expressava FoxP3 aumentou. De fato, em algumas amostras obteve-se percentagens de ~88% de células CD25⁺⁺FoxP3⁺ e percentagens de ~95% de células CD25⁻CD127⁺. No entanto, no gate de CD25⁻ obtivemos expressão para FoxP3 (Figura 14). Portanto, a mesma expressão não se encontrava confinada às células CD25⁺⁺. Não obstante, a análise comparativa entre os dois marcadores, nos três níveis de expressão de CD25, permitiu observar uma relação inversa entre a expressão CD127, FoxP3 e CD25, evidenciada no gráfico da Figura 13.

A expressão de CD127, assim como a de FoxP3, são significativamente diferentes entre os três níveis de CD25. Contudo, a marcação com CD127 apresenta uma diferença muito significativa entre o nível CD25⁺ e CD25⁺⁺, com $P < 0,05$.

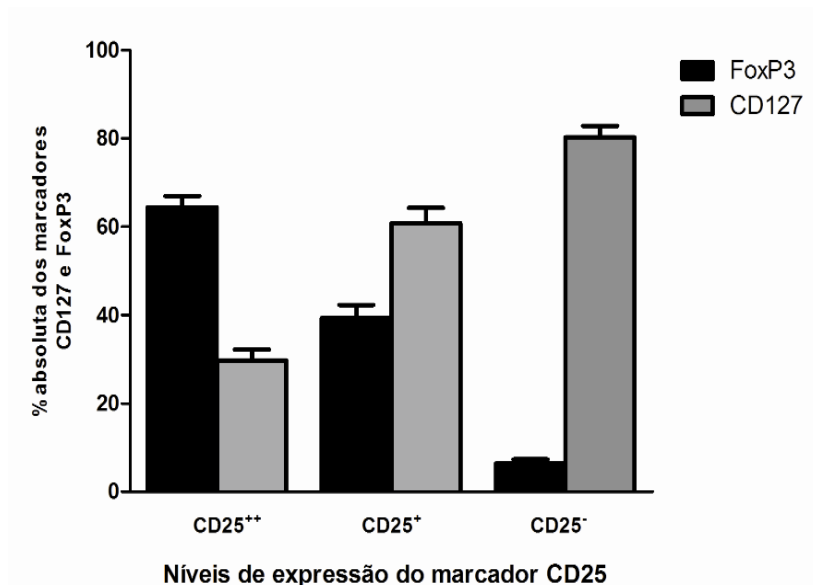


Figura 13 – Representação gráfica da expressão média dos marcadores CD127 e FoxP3, nos três níveis de CD25.

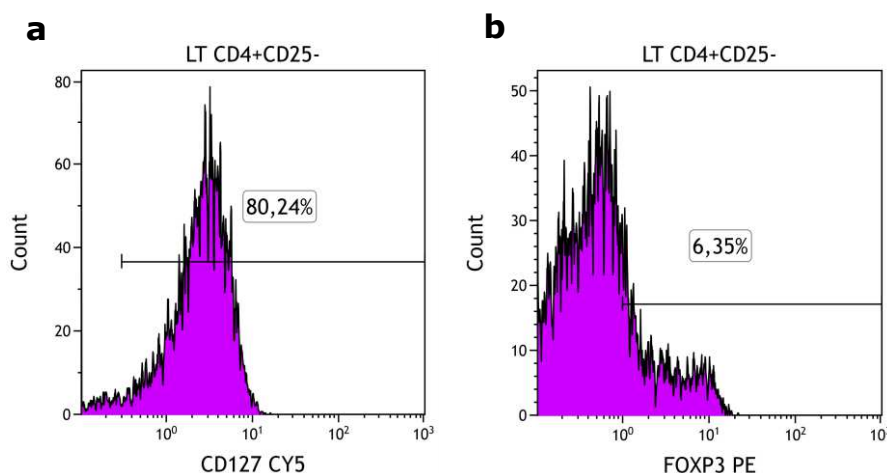


Figura 14 – Expressão média de FoxP3 (a) e CD127(b) nos linfócitos T CD4⁺CD25⁻

3.4 Avaliação dos marcadores CD4, CD127, FoxP3 e CD25

Para que fosse possível avaliar a aplicabilidade do marcador CD127 em detrimento da marcação com FoxP3, procedeu-se à comparação de fenótipos recorrendo à combinação dos CD25/FoxP3 e CD25/CD127.

Na Figura 15 (a) podem ser observadas duas subpopulações: linfócitos T CD25⁻CD127⁺, e a subpopulação de interesse, caracterizada por CD25^{+/++}CD127^{-/low}. Um dos obstáculos na aquisição das Treg, reside na definição da fronteira entre as células caracterizadas por uma expressão forte ou média em CD25, discutido anteriormente. Para contornar esta dificuldade, analisou-se as linhas de densidade do marcador, para cada amostra, representado na Figura 10.

A separação entre as células com expressão forte e média para CD25, permitiu-nos adquirir duas populações distintas, identificadas como região A e B na Figura 15 (a): 1,75±0,85% de LT CD4⁺CD25⁺⁺CD127^{-/low} e 4,35±1,82% de células CD4⁺CD25⁺CD127^{-/low}. As percentagens adquiridas para as duas subpopulações revelaram diferenças significativas, com P<0,05.

Para completar a comparação entre fenótipos, avaliou-se a expressão de FoxP3 e verificou-se que 69,49% dos linfócitos T CD25⁺⁺CD127^{-/low} expressavam FoxP3. Comparativamente apenas 59,27% de LT CD25⁺CD127^{-/low} expressavam FoxP3 (Tabela 2).

Com a utilização de FoxP3 versus CD25 a separação entre os dois subgrupos não foi tão evidente, como mostra a Figura 16. Para a combinação dos marcadores CD25/FoxP3 foi também aplicado o mesmo procedimento. A região C

da Figura 16 corresponde ao gate das células com expressão média para CD25, a região D o gate das células com expressão forte para CD25.

As percentagens médias dos dois subgrupos foram $3,60 \pm 2,30\%$ para as células $CD4^+CD25^+FoxP3^+$, e $1,43 \pm 0,77\%$ para os LT $CD4^+CD25^{++}FoxP3^+$. À semelhança do marcador CD127, a análise comparativa revelou diferenças significativas entre as duas percentagens, com $P < 0,05$.

Em algumas amostras, em ambas as regiões C e D, a expressão negativa ou fraca de CD127 foi superior a 90%. No entanto, a expressão revelou alguma variabilidade de resultados.

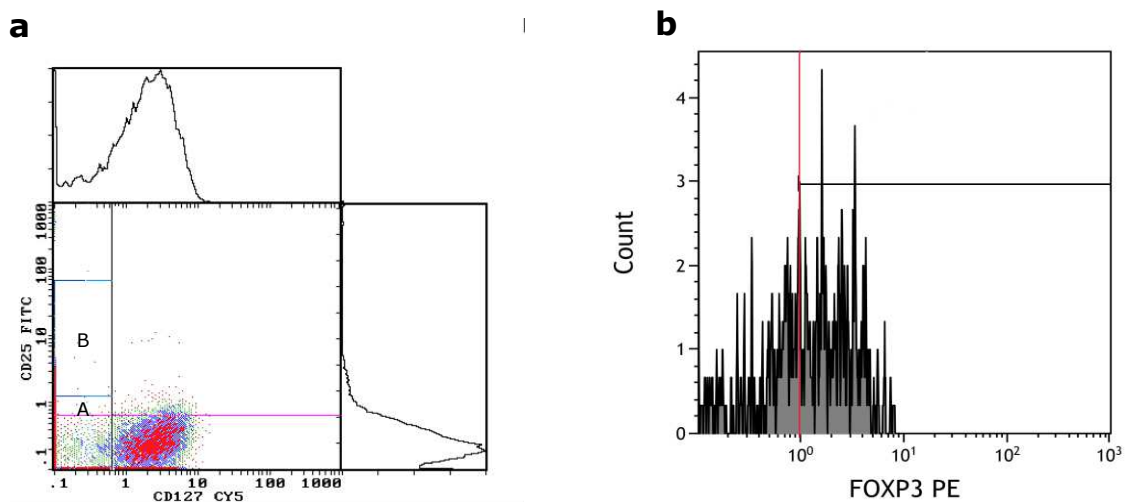


Figura 15 – (a) Expressão de CD127 em LT $CD4^+CD25^+$ (A) e $CD25^{++}$ (B). (b) Histograma representativo para a obtenção da expressão de FoxP3 nos LT gateados na região A e B.

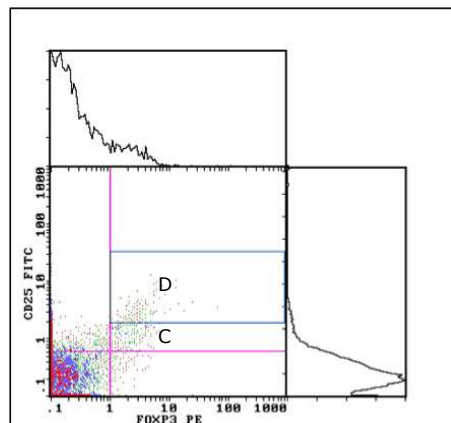


Figura 16 – Expressão de FoxP3 em LT $CD4^+CD25^+$ (C) e $CD25^{++}$ (D).

A avaliação inversa das células da Figura 12 (a), mostrou que os LT $CD4^+CD127^{-/low}$, contrariamente às células $CD25^-$ representadas na Figura 17 (b), eram na sua maioria $CD25^+FoxP3^+$. Os LT $CD4^+CD127^+$ apresentaram baixa expressão de FoxP3.

Interessantemente, o estudo da expressão de FoxP3 nos subgrupos $CD127^+$ e $CD127^{-/low}$ indicou uma relação inversa entre marcadores (Figura 18). Em quase todas as amostras a maior percentagem de células $FoxP3^+$ apresentavam o fenótipo $CD127^{-/low}$. Através da combinação de CD127 versus FoxP3 foi possível adquirir $3,61 \pm 1,34\%$ de células reguladoras com o fenótipo $CD4^+CD127^{-/low}FoxP3^+$.

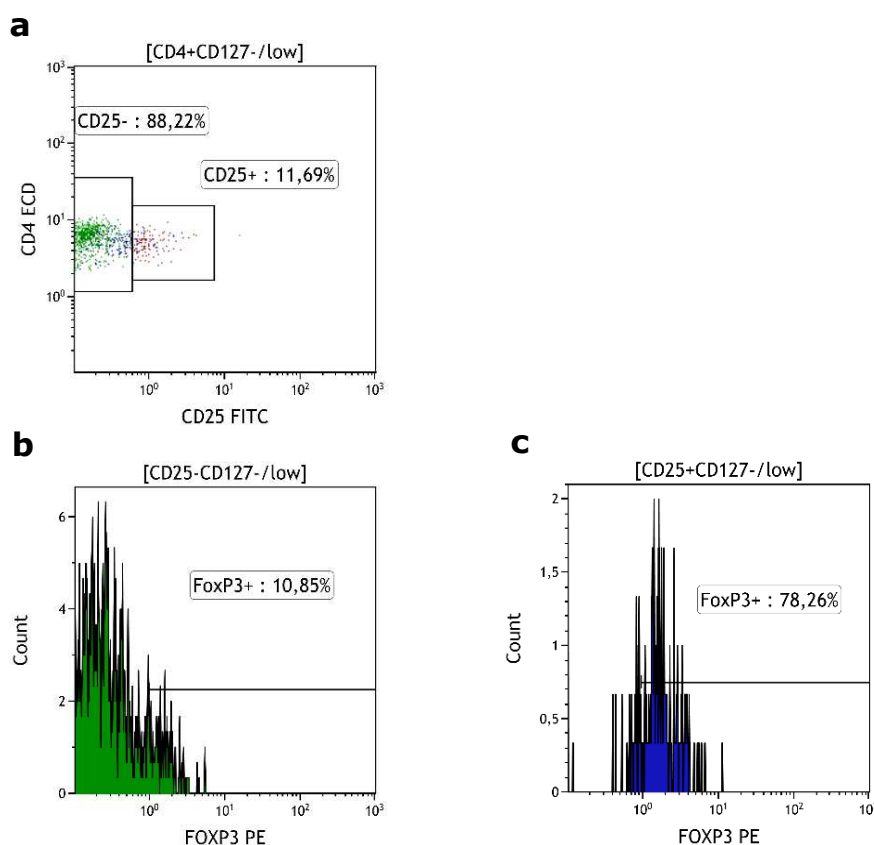


Figura 17 – (a) Expressão de CD25 na subpopulação $CD4^+CD127^{-/low}$. (b) e (c) Expressão de FoxP3 nos LT $CD4^+CD25^-CD127^{-/low}$ e $CD25^+CD127^{-/low}$, numa amostra de um dador saudável.

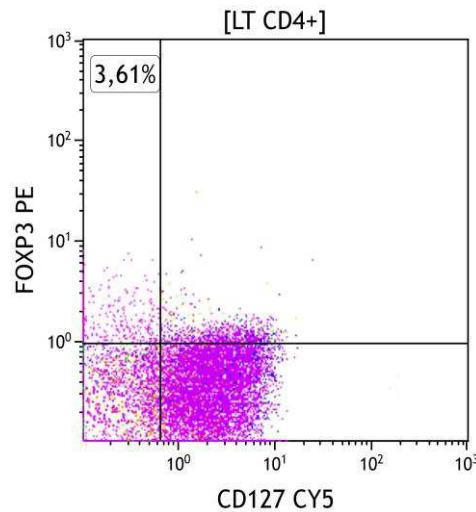


Figura 18 – Relação entre a expressão de FoxP3 e CD127, nos linfócitos CD4⁺. Quase todas as amostras revelaram uma inversão na expressão entre os dois marcadores. A maior percentagem de células FoxP3⁺ eram do tipo CD127^{-/low}.

Como já foi referido anteriormente, a pureza da população de Treg é avaliada pela percentagem de células que expressam FoxP3. Logo, era importante conhecer a mesma em todos os subgrupos de CD127 identificados na Tabela 2. De fato, obteve-se maior percentagem e menor variabilidade entre amostras com a estratégia citométrica CD4⁺CD25⁺⁺CD127^{-/low}, bem evidente no gráfico da Figura 19.

Tabela 2 - Percentagem das células FoxP3⁺ nos diferentes subgrupos de CD127.

Subpopulações de CD127	% Média de FoxP3	Intervalo
CD4 ⁺ CD127 ^{low}	10,07	0,51 – 36,05
CD4 ⁺ CD127 ^{-/low}	11,87	0,82 – 39,25
CD4 ⁺ CD127 ⁺	5,68	0,38 – 22,04
CD4⁺CD25⁺CD127^{-/low}	59,27	16,39 – 88,38
CD4⁺CD25⁺⁺CD127^{-/low}	69,49	38,43 – 88,61
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{-/low}	8,30	1,43 – 28,99
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁺	18,70	2,2 – 44,75
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁺	4,43	0,15 – 16,19

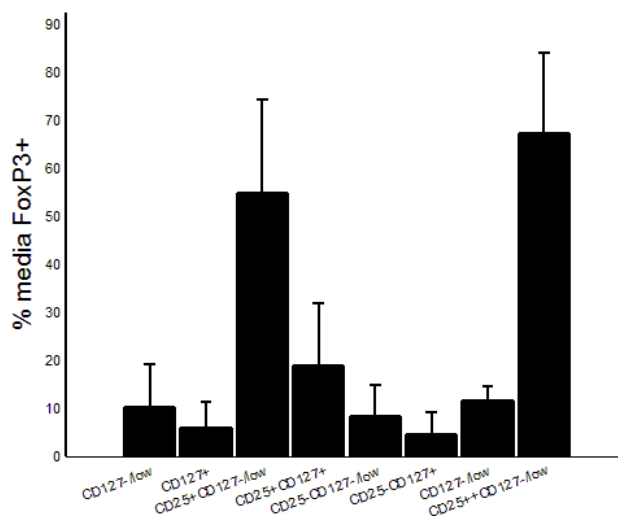


Figura 19 -- Representação gráfica da expressão de FoxP3 nos diferentes subgrupos de CD127.

Na Tabela 3 avalia-se as percentagens médias dos 4 painéis fenotípicos utilizados na aquisição da população das Treg. Permitiu-nos constatar que:

- Independentemente do marcador utilizado, o intervalo de [1,43%-4,35%] foi inferior ao encontrado na revisão bibliográfica;
- A combinação de CD25/CD127 possibilitou a aquisição de percentagens de células Treg superiores às obtidas com FoxP3.

Não obstante, a marcação com CD127 não apresentou diferenças significativas à marcação com FoxP3, independentemente da expressão de CD25^{+/++}. Contudo, para o mesmo marcador, a expressão média e forte de CD25 apresentou diferenças significativas, com $P < 0,05$.

Finalizou-se a análise dos marcadores averiguando a sua correlação. Existe uma melhor correlação linear entre os fenótipos CD25⁺⁺CD127^{-/low}/CD25⁺⁺FoxP3⁺, com um $R = 0,905118$. No entanto, como se constata na imagem da Figura 20 (a), para atingir este valor de correlação foi necessário proceder à eliminação de dois pontos assinalados na mesma figura.

Tabela 3 – Percentagem média da população de Treg nos diferentes fenótipos.

Caracterização Fenotípica dos LT	% Média
$CD4^+CD25^+CD127^{-/low}$	$4,35 \pm 1,82$
$CD4^+CD25^+FoxP3^+$	$3,60 \pm 2,30$
$CD4^+CD25^{++}CD127^{-/low}$	$1,75 \pm 0,85$
$CD4^+CD25^{++}FoxP3^+$	$1,43 \pm 0,77$

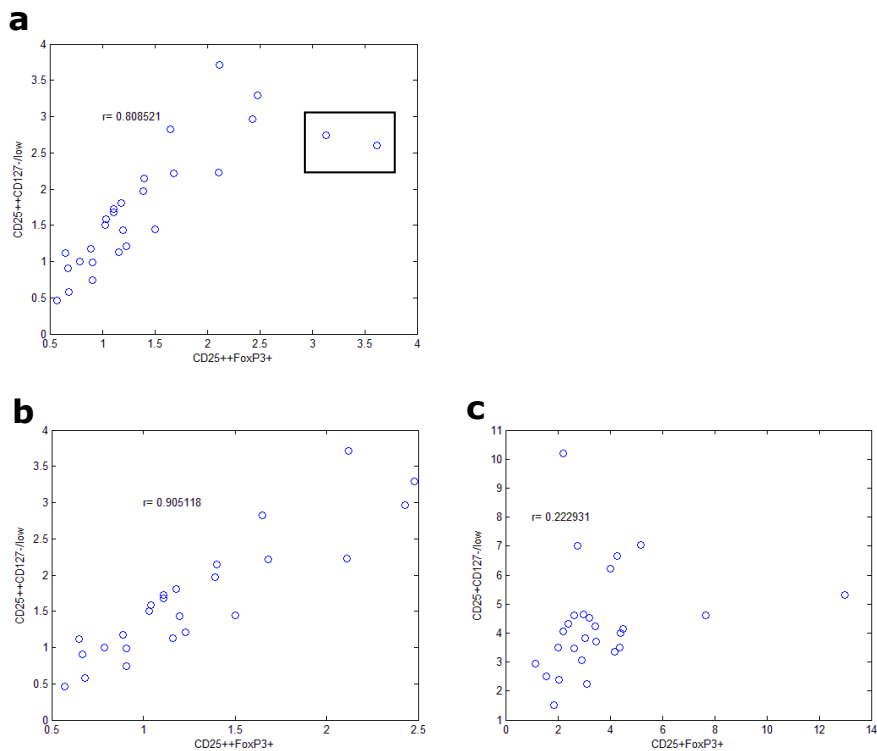


Figura 20 – (a) e (c) Correlação linear, nas amostras de doadores, entre os LT $CD4^+CD25^{++}FoxP3^+$ e $CD25^{++}CD127^{-/low}$. (b) Correlação linear recalculada, através da eliminação dos dois pontos assinalados.

3.5 Prevalência da população de Treg em doentes com AR

A utilização de diferentes fenótipos para definir a população de células T reguladoras, poderá ser uma das causas das discrepâncias de resultados de prevalência e funcionalidade em doenças auto-imunes, entre as quais Artrite Reumatóide.

Após a análise da população das Treg em amostras de dadores saudáveis com a aquisição dos respetivos valores de referência, pode-se avançar com o estudo das amostras de doentes.

Na Tabela 4, constata-se que, à semelhança dos dadores, a caracterização dos LT com o marcador CD127 permitiu obter percentagens superiores às adquiridas com FoxP3. No entanto, as diferenças não eram igualmente significativas, com $P < 0,05$. De igual modo, a marcação com CD25 influenciou a percentagem de Treg. Foram obtidas percentagens inferiores e significativamente diferentes selecionando apenas as células caracterizadas pela expressão forte em CD25.

De facto, os doentes com AR apresentaram valores semelhantes de Treg quando comparados com os dadores. Visualmente, verifica-se que não existem diferenças significativas entre dadores e doentes, com $P < 0,05$ (Figura 21).

Apesar das semelhanças, a correlação linear entre marcadores apresentou valores muito baixos (Figura 22). Contudo, os fenótipos $CD25^{++}CD127^{-/low}/CD25^{++}FoxP3^{+}$ também apresentam a melhor correlação linear, quando comparada com $CD25^{+}CD127^{-/low}/CD25^{+}FoxP3^{+}$, sendo que a amostragem de doentes foi de apenas 11.

Tabela 4 – Percentagens médias da população de Treg nos 4 fenótipos estudados, nos dadores e doentes.

	Dadores	Doentes
$CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}$	$3,60 \pm 2,30$	$2,37 \pm 0,85$
$CD4^{+}CD25^{+}CD127^{-/low}$	$4,35 \pm 1,82$	$3,90 \pm 1,89$
$CD4^{+}CD25^{++}FoxP3^{+}$	$1,43 \pm 0,77$	$1,43 \pm 0,65$
$CD4^{+}CD25^{++}CD127^{-/low}$	$1,75 \pm 0,85$	$2,39 \pm 1,36$

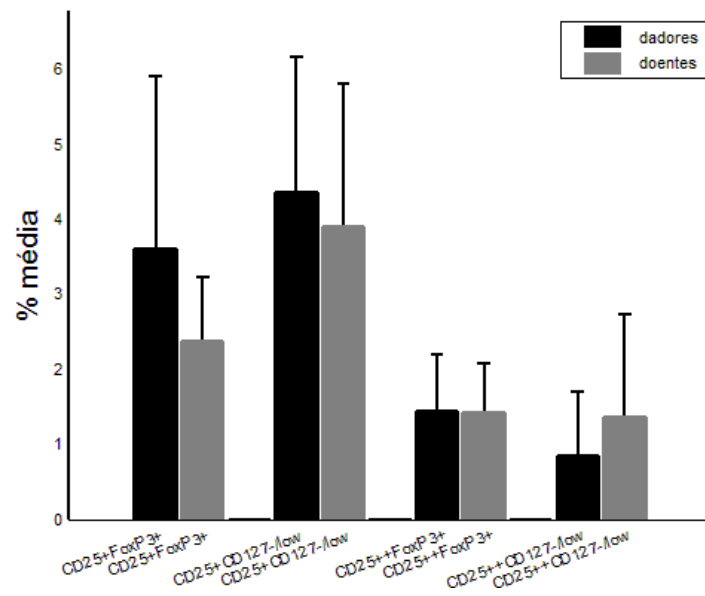


Figura 21 – Comparação entre dadores e doentes. Não foram observadas diferenças significativas entre dadores e doentes, para o mesmo fenótipo da população de Treg.

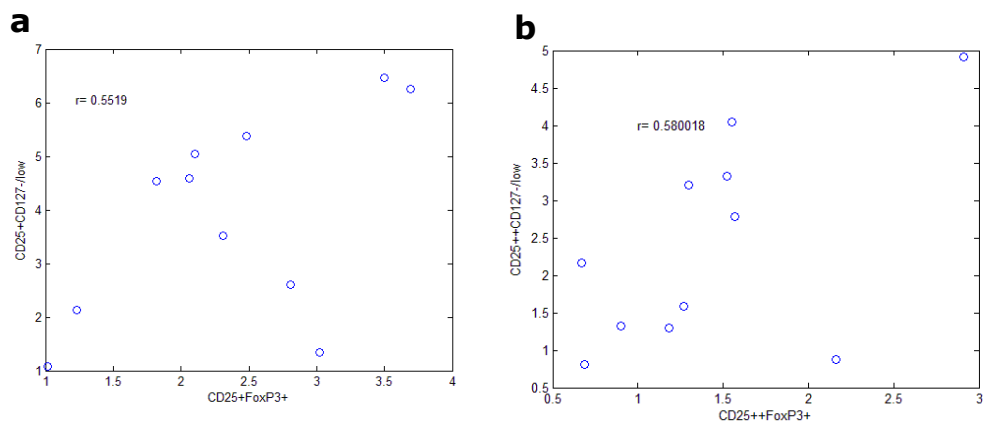


Figura 22 – Correlação linear, nas amostras de doentes, entre os LT $CD4^+$ $CD25^{+/++}FoxP3^+$ e $CD25^{+/++}CD127^{-/low}$.

4 Discussão e Conclusão

Todo sistema biológico é constituído por mecanismos de auto-regulação. Mas como qualquer mecanismo está sujeito a falhas, exemplo são os LT auto-reativos encontrados no sangue periférico de indivíduos saudáveis, que “escaparam” ao processo de seleção negativa que ocorre no timo (Kindt, et al., 2007). Contrariamente ao que seria de esperar, estes indivíduos nunca irão apresentar episódios auto-imunes.

A contribuição da regulação imunológica, realizada na periferia pelas células T reguladores – Treg -- ficou comprovada com a observação do desenvolvimento espontâneo de doenças auto-imunes após a eliminação de LT CD4⁺CD25⁺ e, posteriormente, pela relação direta entre o desenvolvimento da síndrome IPEX e a presença de mutantes do gene FoxP3 (Sakaguchi, et al.,1995). As Treg estão envolvidas na regulação/limitação de um conjunto de processos fisiológicos e uma disfunção ou deficiência no seu número são suficientes para alterar o processo da auto-tolerância.

As Treg são, tipicamente, caracterizadas pelo marcador de superfície CD25 (IL-2R α) e pela expressão intranuclear do fator de transcrição Forkhead box P3. O simples estudo quantitativo das Treg continua a representar um grande desafio, devido à grande heterogeneidade na população deste tipo de linfócitos e à falta de um marcador capaz de, só por si, definir os linfócitos T reguladores.

O marcador CD25 apresenta limitações, uma vez que qualquer célula T ativada expressa o marcador de superfície, impossibilitando a correta separação entre as Treg e células T convencionais. O marcador FoxP3, apesar de até aos nossos dias ser considerado o marcador major, apresenta algumas incongruências:

- A sua expressão não se correlaciona com CD25. Em todos os níveis de expressão de CD25 pode-se encontrar expressão de FoxP3, logo a combinação de CD25/FoxP3 fica comprometida;
- As células T convencionais podem expressar FoxP3, embora transitória e com menor intensidade;

- As células T reguladoras, em determinadas condições podem perder a expressão de FoxP3 – por exemplo, quando iniciam a proliferação em ambientes deficientes em células T.

Em termos laboratoriais, a quantificação das Treg recorrendo à marcação intracelular com FoxP3 apresenta algumas desvantagens:

- Tem um custo mais elevado porque necessita do passo de permeabilização;
- O procedimento é muito demorado, são necessárias aproximadamente 4 horas para a sua execução;
- A permeabilização provoca alterações citomorfológicas, inutilizando as células para possíveis estudos funcionais.

Devido às dificuldades/desvantagens apontadas à utilização da expressão de FoxP3, foram procurados outros marcadores passíveis de a substituir. Atualmente, sabe-se que as Treg são também caracterizadas por uma baixa expressão de CD127 (IL-7R α), podendo assim ser demarcadas das restantes células T. FoxP3 é responsável pela regulação de vários genes, e atua também sobre o promotor de CD127, exercendo uma regulação negativa. Tecnicamente, CD127 é uma marcação de superfície, logo, não apresenta as desvantagens apontadas à marcação com FoxP3 (Liu, et al., 2006).

O presente trabalho teve como objetivo demonstrar a aplicabilidade da marcação com CD127 na quantificação da população das Treg, em substituição de FoxP3.

Foram utilizadas diferentes estratégias citométricas com os marcadores CD4, CD25, FoxP3 e CD127, possibilitando a obtenção de diferentes painéis fenotípicos, assim como a sua caracterização, grau de pureza e comparação estatística. Para a concretização do projeto foram utilizados 27 doadores presumivelmente saudáveis e 11 doentes com AR diagnosticada e medicados com Rituximab. O grupo de doadores permitiu a obtenção de valores de referência para o Serviço de Imunologia, críticos para uma correta interpretação de resultados, como parte integrante do controlo interno do laboratório. Assim como, a posterior comparação com os valores obtidos para a população de doentes,

permitindo caracterizar a população de Treg presentes em doentes auto-imunes como normal, diminuída ou aumentada.

A primeira questão colocada foi, se seria possível a quantificação da população das Treg recorrendo apenas à combinação dos marcadores CD4/CD127 ou CD4/FoxP3. Para clarificar a questão, foram selecionados os LT CD4⁺ que apresentavam apenas expressão fraca para CD127 (CD127^{low}) e LT CD4⁺ que, simultaneamente, não expressavam CD127 ou tinham expressão fraca para CD127 (CD127^{-/low}). Os valores obtidos foram bastante razoáveis, CD4⁺CD127^{low} 6.76±1,59%, CD4⁺CD127^{-/low} 11.38±3,13%. No entanto, eram significativamente diferentes, com P<0,05. Os LT CD4⁺CD127^{low} e CD4⁺CD127^{-/low} eram duas subpopulações que apesar de constituídas por linfócitos que expressavam CD25 e FoxP3, apresentavam também LT CD25⁺ que não expressavam o marcador major FoxP3. Conclui-se que, as médias obtidas estariam sobrequantificadas. A percentagem média de células a expressar FoxP3⁺, nos dois fenótipos (grau de pureza), revelou-se bastante baixa. Ou seja, dois subgrupos semelhantes entre si, mas muito heterogêneos e com um grau de pureza que não ultrapassou os 12%. Em termos práticos, esta estratégia não seria a mais adequada para a obtenção da população de interesse.

As células T CD4⁺FoxP3⁺, aparentemente, eram mais homogêneas na expressão de CD25, a maior percentagem de células CD25⁺ eram do tipo CD127^{-/low}. No entanto, como na população anterior, era constituída por células que sendo CD25⁺ eram também CD127⁺. Portanto, estávamos a adquirir 8,48±4,35% de linfócitos T que não eram apenas reguladores.

Foi possível aferir que os fenótipos CD4⁺CD127^{-/low} e CD4⁺FoxP3⁺ não eram indicados para a quantificação da população periférica de Treg. No entanto, para uma posterior combinação de marcadores, o fenótipo CD127^{-/low}, seria o indicado uma vez que permitiu obter uma maior percentagem de linfócitos.

Alguns autores defendem que as Treg são apenas os LT com forte expressão em CD25 (Baccher-Allan, et al., 2001). Este motivo levou-nos a analisar a relação entre a expressão de FoxP3 e CD127 nos vários níveis de expressão de CD25. Os resultados do presente trabalho demonstraram uma relação inversa entre os marcadores CD127, FoxP3 e CD25. À medida que se avançou na expressão de

CD25 obteve-se um aumento de células a expressar FoxP3. Contudo, esta expressão não se restringiu aos níveis CD25⁺ e CD25⁺⁺. Como Liu e colaboradores (Liu, et al., 2006), adquiriu-se 6,35% de células CD25⁻FoxP3⁺. Ou seja, a combinação de CD25/FoxP3 poderia implicar a subquantificação das Treg.

Com a marcação de CD127 os resultados foram semelhantes mas inversos. Ambos os marcadores apresentaram diferenças significativas entre os vários níveis de expressão de CD25. No entanto, foi o marcador CD127 que apresentou diferenças mais acentuadas, ficando implícito uma melhor relação CD25/CD127.

Com a associação dos marcadores CD127 e CD25 foi possível obter dois fenótipos distintos, identificados na Figura 15 como região A e B. Com o parâmetro menos restrito de CD25 obteve-se 4,35±1,85% de células com o fenótipo CD4⁺CD25⁺CD127^{-/low}, em comparação com 1,75±0,85% de células CD4⁺CD25⁺⁺CD127^{-/low}. As duas subpopulações para além de apresentarem médias significativamente diferentes, com P<0,05, apresentaram graus de pureza diferentes, 69,49% e 59,27%, respetivamente. De notar, que apesar da percentagem de ~70% estar afastada do valor esperado, em algumas amostras obteve-se percentagens superiores a 80%. Contudo, nenhuma amostra apresentou valores de 98%, descritos nos trabalhos de Liu e colaboradores ou Seddiki e colaboradores (Seddik, et al., 2006; Liu, et al., 2006).

Com a utilização de FoxP3 em conjunto com o marcador CD25 obteve-se percentagens relativamente mais baixas: 3,60±2,30% de LT CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ e de 1,43±0,77% de LT CD4⁺CD25⁺⁺FoxP3⁺, não apresentando diferenças significativas com os seus pares marcados com CD127.

A Figura 18 mostra uma relação inversa entre os marcadores CD127 e FoxP3. Em quase todos os dados a maior percentagem de células FoxP3⁺ era também CD127^{-/low}. Com a caracterização das células CD4⁺CD25^{+/++}FoxP3⁺ verificou-se, em algumas amostras, que 90% eram do tipo CD127^{-/low}, reforçando a relação inversa das expressões dos marcadores.

O grau de pureza de ~70% da subpopulação CD4⁺CD25⁺⁺CD127^{-/low} não atingiu os valores espectáveis. Por esse motivo procedeu-se a uma análise inversa da subpopulação de LT CD4⁺CD127^{-/low} (Figura 18). Verificou-se, no gate das células CD25⁻, que a percentagem de células a expressar FoxP3 é muito

reduzida, em comparação com o gate CD25⁺, em que a maior parte das células eram FoxP3.

Através deste conjunto de resultados conclui-se que:

- A combinação CD25/CD127 poderá apresentar-se como uma alternativa, menos complexa, à associação CD25/FoxP3;
- As percentagens obtidas com CD127, apesar de superiores, não revelaram diferenças significativas com as adquiridas com FoxP3, com $P < 0,05$;
- Os marcadores CD25 e CD127 apresentaram uma boa relação inversa, bem como CD127 e FoxP3;
- Deve-se adquirir apenas as células com expressão forte em CD25. Ou seja, a imunofenotipagem CD4⁺CD25⁺⁺CD127^{-/low} apresentou o grau de pureza mais elevado, bem como a melhor correlação linear com o fenótipo CD25⁺⁺FoxP3⁺.
- Os valores de referência para a população das Treg em dadores saudáveis com idades compreendidas entre 33 e 63 anos são [0,90 – 2,60%] em linfócitos T CD4⁺.

Assim, e apesar da avaliação dos vários fenótipos ter demonstrado que a imunofenotipagem mais adequada com recurso à marcação de superfície com CD127 ser, CD4⁺CD25⁺⁺CD127^{-/low}, não foi possível afirmar com confiança:

- A marcação com CD127 não permitiu obter uma população suficientemente pura, apesar de algumas amostras apresentarem percentagens superiores a 80% de expressão de FoxP3;
- As percentagens obtidas para a população de Treg com ambos os marcadores, foram inferiores às verificadas na literatura.

No âmbito de um outro projeto, o Serviço de Imunologia teve a necessidade de proceder à obtenção/confirmação dos seus valores de referência para algumas marcações, entre as quais, a percentagem de CD25 em CD4. O intervalo obtido foi de [8-14%] em adultos entre 25 a 75 anos, também ele inferior ao estudado na literatura e corroborante com os resultados obtidos para a população de Treg. Não obstante, para proceder a uma correta validação da metodologia necessitaríamos de uma amostragem mínima de 40 dadores.

As amostras dos doentes sofreram o mesmo procedimento, sem diferenças significativas entre pares. Estes resultados permitiram-nos concluir que a população de doentes com Artrite Reumatóide apresenta valores normais de linfócitos T reguladores.

Alguns pontos de melhoramento poderam ser apontados para este projeto. Como já foi referido, o aumento de amostragem de dadores é crucial para uma correta validação da metodologia. A amostragem de apenas 11 doentes poderá ter influenciado a baixa correlação linear entre fenótipos.

O fato de o procedimento técnico ter sido efetuado numa única plataforma de aquisição no citómetro, trouxe vantagens para o procedimento técnico e comparação nas marcações. Contudo, e para que a fixação/permeabilização não fosse um passo negativo para a marcação de superfície, esta deveria ter sido testada em paralelo.

A escolha do fluorocromo influencia também a qualidade da marcação. O fluorocromo PE permite uma melhor separação entre CD25⁻ e CD25⁺, no entanto, este foi utilizado para anti-FoxP3 PE (Law, et al., 2009).

A fixação/permeabilização, sendo um passo sensível no procedimento técnico, poderia ter sido incrementado com comparações com outros Kits. A localização da FoxP3 é intra-nuclear, logo de mais difícil acesso.

Um outro ponto que poderá levantar algumas dúvidas, é o fato de todos os doentes envolvidos no presente estudo encontrarem-se medicados com Rituximab. Como foi referido anteriormente, Rituximab é um anticorpo monoclonal específico para o antígeno de superfície CD20, expresso pelos linfócitos B e seus percursoros. É uma droga biológica, utilizada no tratamento da AR quando o paciente não responde a pelo menos duas associações de drogas modificadoras do curso da doença (DMCD), incluindo Metotrexato (MTX). Aparentemente, os resultados do presente trabalho mostram que Rituximab não tem ação sobre a subpopulação de linfócitos T. Contudo, deveremos ser cautelosos nesta afirmação. De salientar o trabalho conduzido por Pérez e colaboradores, que apresentou resultados indicativos de um aumento significativo do número e função das Treg, em doentes perscritos com Rituximab (Vigna-Pérez, et al.,

2006). Sendo assim, o projeto deveria ter sido complementado com grupo controlo de doentes com AR sem medicação administrada.

Apesar das questões já levantadas, o marcador CD127 parece ser uma alternativa fiável à marcação com FoxP3. Apesar da percentagem de células T reguladoras no sangue periférico estar diminuída em relação aos valores de referência estudados na literatura, obteve-se, para doadores e doentes, percentagens mais elevadas com a associação CD25/CD127. Contudo, as características da expressão contínua de CD127 e CD25 dificultam a interpretação de resultados.

5 Perspetivas Futuras

O estudo quantitativo da população das Treg periférica deverá ser o primeiro passo na caracterização clínica. Uma melhor compreensão sobre a população de Treg num determinado indivíduo, permite monitorizar, e possivelmente permitirá “afinar” a terapia a aplicar a cada doente.

Existem muitos pontos subjectivos e complexos na quantificação das Treg por CMF, fato que reforça a importância deste projeto em trabalhos futuros, assim como na investigação da terapia celular para as doenças auto-imunes. Como seja, a complexidade inerente à interpretação de resultados na quantificação, ou o tratamento com imunossuppressores e a estimulação das Treg. Os agentes biológicos são muito eficazes no combate dos sintomas e na progressão da doença, tendo como vantagem em relação às drogas modificadoras do curso da doença, o fato de terem uma ação inicial rápida, evitando novas deformações nas articulações, no caso da AR. No entanto, são apenas utilizados quando a terapia convencional não apresenta resultado, representando ainda custos muito elevados no nosso sistema nacional de saúde, mas mais importante poderão produzir efeitos secundários graves, e inadvertidamente, provocarem um aumento da suscetibilidade a infeções e tumores (Boissier, et al., 2009).

O tratamento ideal para as doenças auto-imunes, defendida por alguns investigadores, reside na eliminação parcial de linfócitos T auto-reativos – especialmente células efectoras patogénicas e de memória – para frequências encontradas em indivíduos normais, seguida pelo estabelecimento da população das Treg, reforçando, uma vez mais, a ideia da necessidade de um equilíbrio entre populações.

Apesar da dificuldade técnica laboratorial ainda associada ao estudo das Treg, o desenvolvimento de novas drogas biológicas que têm como base as Treg ou alvos sobre os quais recaem a atuação das mesmas, parecem ter um futuro promissor no aperfeiçoamento da terapia aplicada à AR e outras doenças auto-imunes. Sendo assim, e apesar da dificuldade já referida, este estudo permitirá ao Serviço de Imunologia incrementar a informação clínica dos doentes do serviço de Reumatologia e outros na área da auto-imunidade, quando solicitado.

6 Bibliografia

- Akbari, O., Stock, P., Dekruyff, R. H., & Umetsu, D. T. (2003). Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Current Opinion in Immunology*, 15(6), 627-33.
- Anderson, A. E., & Isaacs, J. D. (2008). Tregs and rheumatoid arthritis. *Acta Reumatológica Portuguesa*, 33(1), 17-33.
- Arosa, A. F., Cardoso, E. M., & Pageco, F. C. (2007). Fundamentos de Imunologia. Lidel, 128-42.
- Ashley, C. W., & Baecher-Allan, C. (2009). Cutting Edge: Responder T cells regulate human DR+ effector regulatory T cell activity via granzyme B. *The Journal of Immunology*, 183(12), 4843-7.
- Baccher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J., & Hafler, D. A. (2001). CD4+CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *The Journal of Immunology*, 167(3), 1245-52.
- Bayer, A. L., Lee, J. Y., de la Barrera, A., Surh, C. D., & Malek, T. R. (2008). A function for IL-7R for CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory cells. *The Journal of Immunology*, 181, 225-34.
- Beissert, S., Schwarz, A., & Schwarz, T. (2006). Regulatory T cells. *The Society for Investigative Dermatology*, 126, 15-24.
- Bennett, C. L. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature Genetics*, 27, 20-21.
- Billiard, F., Litvinova, E., Saadoun, D., Djelti, F., Klatzmann, D., & Cohen, J. I. (2006). Regulatory and effector T cell activation levels are prime determinantes of in vivo immune regulation. *The Journal of Immunology*, 177, 2167-74.
- Boissier, M. C., Assier, E., & Falgarone, G. (2008). Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/treg: the changing rheumatoid arthritis paradigm. *Joint Bone Spine*, 75, 373-75.

- Boissier, M. C., Assie, E., Biton, J., Denys, A., Fagarone, G., & Bessis, N. (2009). Regulatory T cells (Treg) in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*, 76, 10-14.
- Borrego, L. M., Rosa, S., Alguero, C., Trindade, H., & Pinto, J. R. (2007). Células Reguladoras. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, XII(3), 365-76.
- Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paepers, B., Clark L.B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature Genetics*, 27(1), 68-73.
- Buckne, J. H., & Ziegler, S. F. (2008). Functional analysis of FOXP3. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1143, 151-169.
- Burns, J., Rosenzweig, A., Zweiman, B., & Lisak, R. P. (1983). Isolation of myelin basic protein-reactive T-cell lines from normal human blood. *Cellular Immunology*, 81(2), 435-40.
- Chatila, T. A. (2000). Encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 106, 75-81.
- Collison, B. S., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K., et al. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 450, 566-69.
- Constantino, C. M., Baecher-Allan, C. M., & Hafler, D. A. (2008). Human regulatory T cells and autoimmunity. *The European Journal of Immunology*, 38, 921-24.
- Cruvinel, W. M., Mesquita, D., Araújo, J. A., Salmazi, K. C., Kállas, E. G., & Andrade, I. E. (2008). Células T Reguladoras Naturais (Tregs) em Doenças Reumáticas. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 48(6), 342-55.
- Dejaco, C., Loebenstein, B. G., & Schirmer, M. (2005). Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Immunology*, 117(13), 289-95.

- Ehrenstein, M.R., Evans, J.G., Singh, A., Moore, S., Warnes, G., Isenberg, D.A., Mauri, C. (2004). Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *The Journal of Experimental Medicine*, 200(3), 277-285.
- Esensten, J. H., Wofsy, D., & Bluestone, J. A. (2009). Regulatory T cells as therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *Nature*, 5, 560-65.
- Faria, B. A., Silva, S. M., Abreu, M. T., & Napimoga, M. H. (2008). Ação dos Linfócitos T regulatórios em transplantes. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 30(4), 309-15.
- Fehérvári, Z., & Sakaguchi, S. (2004). CD4+ tregs and immune control. *The Journal of Clinical Investigation*, 114, 1209-17.
- Floess, S., Freyer, J., Siewert, C., Baron, U., Olek, S., Polansky, J., Schlawe, K., Chang, H.D., Bopp, T., Schmitt, E., Klein-Hessling, S., Serfling, E., Hamann, A., Huehn, J. (2007) Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol*, 5(2):e38.
- Fontenot, J. D., & Rudensky, A. Y. (2005). A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nature Immunology*, 6, 331-37.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunology*, 4, 330-36.
- Gavin, M. A. (2006). Single-cell analyses of normal and FOXP3-mutant T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 6659-64.
- Gay, D., Saunders, T., Camper, S., & Weigert, M. (1993). Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *The Journal of Experimental Medicine*, 173, 999-1008.

- Gershon, R. K., & Kondo, k. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of Thymic lymphocytes. *Immunology*, 18(5), 723-37.
- Godfrey, V. L., Wilkinson, J. E., & Russel, L. B. (1991). X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse. *The American Journal of Pathology*, 138(6), 1379-87.
- Hafler, G. L. & Cvetanovich, A. D. (2010). Human regulatory T cells in autoimmune diseases. *Current Opinion in Immunology*, 22(6), 753-60.
- Hoffmann, P., Boeld, T.J., Eder, R., Huehn, J., Floess, S., Wieczorek, G., Olek, S., Dietmaier, W., Andreesen, R., Edinger, M. (2009). Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation. *The European Journal of Immunology*, 39(4), 1088-97.
- Hori, S., Nomura, T., & Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cells development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299, 1057-61.
- Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F., Sakaguchi, S. (1999). Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cell as key of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *The Journal of Immunology*, 162(9), 5317-26.
- Jonuleit, H., Adema, G., & Schmitt. (2003). Immune regulation by regulatory T cells: implications for transplantation. *Transplant Immunology* 11, 267-76.
- Jordan, M. S., Boesteanu, A., & Reed, A. J. (2001). Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nature Immunology*, 2(4), 301-6.
- Júnior, D. M., Araújo, J. A., Catelan, T. T., Souza, A. W., Cruvinel, W. M., Andrade, L. E., Silva, N. P. (2010). Sistema Imunitário - parte II. Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Revista Brasileira. Reumatologia*, 50, 552-80.
- Kapp, J. A. (2008). Special regulatory T- cell review: suppressors regulated but unsuppressed. *Immunology*, 123(1), 28-32.

- Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A., & Kuby, J. (2007). Kuby Immunology. W.H. Freeman and Company, 245-70.
- Kukreja, A., Cost, G., Marker, J., Zhang, C., Sun, Z., Lin-Su, K., Ten, S., Sanz, M., Exley, M., Wilson, B., Porcell, S., Maclaren, N. (2002). Multiple immunoregulatory defects in type-1 diabetes. The Journal of Clinical Investigation, 109(1), 131-40.
- Law, J. P., Hirschhorn, D. F., Owen, R. E., Biswas, H. H., Norris, P. L., & Lanteri, M. C. (2009). The importance of foxP3 Antibody and Fixation/Permeabilization Buffer Combination in Identifying CD4+CD25+FoxP3+ Regulatory T cells. International Society for Advancement of Cytometry, 75(A), 1040-50.
- Leipe, J., Alla, S., E, L. P., & Schulze-Koops, H. (2005). Regulatory T cells in rheumatoid arthritis. Arthritis Research and Therapy, 7(3), 93-99.
- Levings, M. K., Sangregorio, R., & Roncarolo, M. G. (2001). Human CD25+CD4+ T regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. The Journal of Experimental Medicine, 193, 1295-302.
- Lima, H. C. (2006). Papel das células T reguladoras no desenvolvimento de dermatoses. Anais Brasileiros de Dermatologia, 81(3), 269-281.
- Lisbon, A., & Rudensky, A. Y. (2007). Thymic development and peripheral homeostasis of regulatory T cells. Current Opinion in Immunology, 19(2), 176-85.
- Liu, W., Putnam, A. L., Xu-Yu, Z., Szot, G. L., Lee, M. R., Zhu, S., et al. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of Human CD4+ T cells. The Journal of Experimental Medicine, 203(7), 1701-11.
- Liu, Y. J. (2006). A unified theory of central tolerance in the thymus. Trends in Immunology, 27, 215-21.

- Marson, A., Kretschmer, K., Frampton, G.M., Jacobsen, E.S., Polansky, J.K., MacIsaac, K.D., Levine, S.S., Fraenkel, E., von, Boehmer, H., Young, R.A. (2007). FoxP3 occupancy and regulation of Key target genes during T-cell stimulation. *Nature*, 445, 931-35.
- Mazzucchelli, R., Hixon, J.A., Spolski, R., Chen, X., Li, W.Q., Hall, V.L., Willette-Brown, J., Hurwitz, A.A., Leonard, W.J., Durum, S.K. (2008). Development of regulatory t cells requires IL-7R alpha stimulation by IL-7 or TSLP. *Blood Journal*, 112, 3283-92.
- Melo, M. k., & Carvalho, T. C. (2009). T regulatory cell: mechanism of action and function in human diseases. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*, 32(5), 184-88.
- Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., Mathian, A., Nakahata, T., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M., Amoura, Z., Gorochoy, G., Sakaguchi S (2009). Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FOXP3 transcription factor. *Immunity*, 30, 899-911.
- Miyara, M., & Sakaguchi, S. (2011). Human FoxP3+CD4+ regulatory T cells: their knowns and unknowns. *Immunology and Cell Biology*, 89(3),346-51.
- Miyara, M., Gorochoy, G., Ehrenstein, M., Musset, L., Sakaguchi, S., & Amoura, Z. (2011). Human FoxP3+ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, 10(12), 744-55.
- Miyara, M., Wing, K., & Sakaguchi, S. (2009). Therapeutic approaches to allergy and autoimmunity based on FoxP3+ regulatory T-cell activation and expansion. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123, 749-55.
- Morgan, M. E., Van Bilsen, J. H., & Bakker, A. M. (2005). Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Human Immunology*, 66, 13-20.
- Nandakumar, S., Miller, C. W., & Kumaraguru, U. (2009). T regulatory cells: an overview and intervention techniques to modulate allergy outcome. *Clinical and Molecular Allergy*, 12, 7:5.

- Nishizuk, Y., & Sakakura, T. (1969). Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science*, 166(7), 753-55.
- Ohkura, N., Hamaguchi, M., & Sakaguchi, S. (2010). FOXP3 regulatory T cells: control of FOXP3 expression by pharmacological agents. *Trends in Pharmacological Sciences*, 32(3), 158-166.
- Peiffault de Latour, R., Dujardin, H.C., Mishellany, F., Burlen-Defranoux, O., Zuber, J., Marques, R., Di Santo, J., Cumano, A., Vieira, P., Bandeira, A. (2006). Ontogeny, function, and peripheral homeostasis of regulatory t cells in the absence of interleukin-7. *Blood Journal*, 108, 2300-6.
- Putnam, A. L., Vendrame, F., Dotta, F., & Gottlieb, P. A. (2005). CD4+CD25^{high} regulatory T cells in human autoimmune diabetes. *Journal of Autoimmunity* 24, 55-62.
- Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual Reviews of Immunology*, 22, 531-33.
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M., & A, H. D. (2010). FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nature Reviews Immunology*, 10(7), 490-500.
- Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Fehervari, S., Fehervari, Z., et al. (2006). Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunological Reviews*, 212:8-27.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., & Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of Immunology*, 155(3), 1151-64.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., & Ono, M. (2008). Regulatory T cells and Immune Tolerance. *Cell*, 133(5), 775-87.

- Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, S.I., Nanan, R., Kelleher, A., Fazekas de St Groth B.(2006). Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 7, 1693-1700.
- Souza, A. W., Júnior, D. M., Araújo, J. A., Catelan, T. T., Cruviell, W. M., Andrade, L. E., Silva, N. P. (2010). Sistema Imunitário - Parte III O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 50(6), 665-94.
- Tran, D. Q., Ramsey, H., & Shevach, E. M. (2007). Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-B dependent but does not confer regulatory phenotype. *Blood Journal*, 110, 2983-90.
- Vignali, D. A. (2008). Viewpoints on Treg. *The European Journal of Immunology*, 38, 901-37.
- Vigna-Pérez, M., Abud-Mendoza, C., Cuevas-Orta, E., Baranda, L., Paredes-Saharopulos, O., Moreno, R., González-Amaro, R.(2006). In vivo effect of Rituximab on regulatory T cells and apoptosis in patients with rheumatoid arthritis. *Immunology*, 25(3), 176-72.
- Vukmanovic-Stejic, M., Zhang, Y., Cook, J.E., Fletcher, J.M., McQuaid, A., Masters, J.E., Rustin, M.H., Taams, L.S., Beverley, P.C., Macallan, D.C., Akbar, A.N. (2006). Human CD4+CD25highFoxP3+ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populações in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, 116, 2423-33.
- Walker, M.R., Kasprowicz, D.J., Gersuk, V.H., Benard, A., Van Landeghen, M., Buckner, J.H., Ziegler, S.F. (2003). Induction of FoxP3 and acquisition of regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *Journal of Clinical Investigation*, 112, 1437-43.
- Wieczorek, G., Asemisen, A., Model, F., Turbachova, I., Floess, S., Liebenberg, V., Baron, U., Stauch, D., Kotsch, K., Pratschke, J., Hamann, A.,

- Loddenkemper, C., Stein, H., Volk, H.D., Hoffmüller, U., Grützkau, A., Mustea, A., Huehn, J., Scheibenbogen, C., Olek, S. (2009). Quantitative DNA methylation analysis of FOPX3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. *Cancer Research*, 69, 599-608.
- Wildin, R. S. (2001). X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nature Genetics*, 27, 18-20.
- Wilk, E., Witte, T., Marquardt, N., Horvath, T., Kalippke, K., Scholz, K., Wilke, N., Schmidt, R.E., Jacobs, R. (2009). Depletion of Functionally Active CD20+ T Cells by Rituximab Treatment. *American College of Rheumatology*, 60(12), 3563-71.
- Wong, F. S., & Dayan, C. M. (2008). Regulatory T cells in autoimmune endocrine diseases. *Cell*, 19, 292-99.
- Zheng, Y., & Rudensky, A. Y. (2007). Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nature Immunology*, 8(5), 457-62.